



ΕΦΗΜΕΡΙΣ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ

ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ

ΤΕΥΧΟΣ ΠΡΩΤΟ **Αρ. Φύλλου 214**

6 Οκτωβρίου 2000

ΠΡΟΕΔΡΙΚΟ ΔΙΑΤΑΓΜΑ ΥΠ' ΑΡΙΘ. 255

Μέτρα για τον έλεγχο του παθογόνου βακτηρίου των γεωμήλων και της ντομάτας Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al σε συμμόρφωση προς την Οδηγία 98/57/ΕΚ του Συμβουλίου.

Ο ΠΡΟΕΔΡΟΣ
ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ

Έχοντας υπόψη:

1. Τις διατάξεις:

α. του άρθρου 4 του Ν.2147/52 "περί προλήψεως και καταστολής των ασθενειών και εχθρών των φυτών και περί οργανώσεως της φυτοπαθολογικής Υπηρεσίας" (ΦΕΚ/155/τ.Α/5-6-1952).

β. του Π.Δ. 332/ΦΕΚ 178/τ.Α/29-8-95 άρθρου 19 "Μέτρα προστασίας κατά την εισαγωγή στη χώρα ή μέσω αυτής σε άλλο κράτος μέλος της Ευρωπαϊκής Ένωσης οργανισμών επιβλαβών για τα φυτά ή τα φυτικά προϊόντα και κατά της εξάπλωσής τους στο εσωτερικό της, σε συμμόρφωση προς την οδηγία 77/93/ΕΟΚ του Συμβουλίου".

γ. του άρθρου 1 παρ. 1 και 3 του Ν. 1338/83 "εφαρμογή του Κοινοτικού δικαίου" (ΦΕΚ 34/τ.Α/3-3-83) όπως τροποποιήθηκε από το άρθρο 6 του Ν.1440/84 "Συμμετοχή της Ελλάδος στο Κεφάλαιο, στα αποθεματικά και στις προβλέψεις της Ευρωπαϊκής Κοινότητας Άνθρακος και Χάλυβος και του Οργανισμού Εφοδιασμού ΕΥΡΑΤΟΜ" (ΦΕΚ 70/τ.Α/21-5-1984).

γ. Του άρθρου 29Α του Ν. 1558/1985 "Κυβέρνηση και Κυβερνητικά Όργανα" (Α137) όπως το άρθρο αυτό προστέθηκε με το άρθρο 27 του Ν. 2081/1992 (Α 154) και αντικαταστάθηκε από το άρθρο 1 παρ. 2α του Ν. 2469/1997 (Α 38) και του γεγονότος ότι από τις διατάξεις του παρόντος Π. διατάγματος προκαλείται δαπάνη σε βάρος του Προϋπολογισμού του Νομικού προσώπου "Κεντρικό Ταμείο Γεωργίας, Κτηνοτροφίας και Δασών (Κ.Τ.Γ.Κ. και Δασών)" ύψους 15.000.000 δρχ. περίπου για το τρέχον Οικονομικό έτος και 30.000.000 δρχ. περίπου για καθένα από τα επόμενα οικονομικά έτη. Για την ανωτέρω δαπάνη έχει εγγραφεί πίστωση στον Προϋπολογισμό του Νομικού αυτού προσώπου ύψους 15.000.000 δραχμών με τα στοιχεία φορέας 110 και ΚΑΕ 5184.

2. Την 353001/2000 (ΦΕΚ 556/2000) κοινή απόφαση του Πρωθυπουργού και του Υπουργού Γεωργίας για "Ανάθεση αρμοδιοτήτων στους Υφυπουργούς Γεωργίας Ευάγγελο Αργύρη και Φώτη Χατζημιχάλη".

3. Την υπ' αριθ. 269/2000 Γνωμοδότηση του Συμβουλίου της Επικρατείας με πρόταση του Υφυπουργού Εθνικής Οικονομίας και του Υφυπουργού Γεωργίας, αποφασίζουμε:

Άρθρο 1

(Άρθρο 1 Οδηγίας 98/57/ΕΚ)

Ορίζουμε, σε συμμόρφωση προς την οδηγία 98/57/ΕΚ της 20ης Ιουλίου 1998 (Ε.Ε.L 235/21-8-98), την εφαρμογή σ' ολόκληρη τη Χώρα των μέτρων κατά του Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al., παλαιότερα γνωστού ως Pseudomonas solanacearum (Smith) Smith, (εφεξής καλούμενο "ο οργανισμός") σε σχέση με τους ξενιστές του οργανισμού που αναφέρονται στο παράρτημα Ι τμήμα 1 (εφεξής καλούμενοι "καταχωρημένο φυτικό υλικό"), για:

α) τον εντοπισμό του και τον προσδιορισμό της διασποράς του·

β) την πρόληψη της εμφάνισης και της μετάδοσής του·

γ) σε περίπτωση διαπίστωσής του, την πρόληψη της μετάδοσης και την καταπολέμησή του με σκοπό την εξάλειψή του.

Άρθρο 2

(Άρθρο 2 Οδηγίας 98/57/ΕΚ)

1. Η Διεύθυνση Προστασίας Φυτικής Παραγωγής η οποία στο εξής θ' αποκαλείται αρμόδια αρχή πραγματοποιεί ετήσιες συστηματικές επίσημες μελέτες για τον οργανισμό στο καταχωρημένο φυτικό υλικό που προέρχεται από την επικράτεια της Χώρας. Προκειμένου να προσδιοριστούν οι άλλες πιθανές εστίες μόλυνσης που απειλούν την παραγωγή του καταχωρημένου φυτικού υλικού η αρμόδια αρχή πραγματοποιεί αξιολόγηση του κινδύνου και, εκτός από την περίπτωση κατά την οποία ο οργανισμός έχει αναγνωριστεί κατά την αξιολόγηση, διεξάγει, στις περιοχές παραγωγής του καταχωρημένου φυτικού υλικού, στοχοθετημένες επίσημες μελέτες για τον οργανισμό σε φυτά άλλα από το καταχωρημένο φυτικό υλικό, συμπεριλαμβανομένων των άγριων ξενιστών της οικογένειας των σολανωδών, καθώς και στο επιφανειακό νερό που χρησιμοποιείται για άρδευση ή ψεκασμό του καταχωρημένου φυτικού υλικού και στα υγρά απόβλητα που απορρίπτονται από εγκαταστάσεις βιομηχανικής μεταποίησης ή συσκευασίας του καταχωρημένου φυτικού υλικού και που

χρησιμοποιούνται για άρδευση ή ψεκασμό του καταχωρημένου φυτικού υλικού. Η έκταση αυτών των στοχοθετημένων μελετών καθορίζεται ανάλογα με τον διαπιστωμένο κίνδυνο. Η αρμόδια αρχή μπορεί επίσης να διεξάγει επίσημες μελέτες για τον οργανισμό σε άλλο υλικό, όπως υπόστρωμα βλάστησης, χώμα και στερεά απόβλητα από εγκαταστάσεις βιομηχανικής μεταποίησης ή συσκευασίας.

2. Οι επίσημες μελέτες που προβλέπονται στην παράγραφο 1 διενεργούνται:

α) για το καταχωρημένο φυτικό υλικό, σύμφωνα με τις λεπτομέρειες που προβλέπονται στο σημείο 1 του τμήματος ΙΙ του παραρτήματος Ι·

β) για ξενιστές άλλους από το καταχωρημένο φυτικό υλικό, και για το νερό, συμπεριλαμβανομένων των υγρών αποβλήτων, σύμφωνα με τις κατάλληλες μεθόδους και κατά περίπτωση, τα δείγματα λαμβάνονται και υποβάλλονται σε επίσημη ή υπό επίσημη εποπτεία εργαστηριακή δοκιμή·

γ) κατά περίπτωση για άλλο υλικό, σύμφωνα με τις κατάλληλες μεθόδους.

Για τις μελέτες αυτές, οι περαιτέρω λεπτομέρειες των διαδικασιών εποπτείας και ο αριθμός, η προέλευση, η διαστρωμάτωση και ο χρόνος λήψης των δειγμάτων, καθορίζονται με απόφαση της αρμόδιας αρχής κατά την έννοια του Π.Δ. 332/29-8-95/178Α βάσει ορθών επιστημονικών και στατιστικών αρχών και της βιολογίας του οργανισμού, και λαμβανομένου υπόψη του συγκεκριμένου συστήματος παραγωγής του καταχωρημένου φυτικού υλικού και, κατά περίπτωση, άλλων φυτών ξενιστών.

3. Οι λεπτομέρειες και τα αποτελέσματα των επίσημων μελετών που προβλέπονται στην παράγραφο 1, γνωστοποιούνται κάθε χρόνο στις αρμόδιες αρχές των άλλων κρατών μελών και την Επιτροπή σύμφωνα με τις διατάξεις του σημείου 2 του τμήματος ΙΙ παραρτήματος Ι. Οι γνωστοποιήσεις αυτές υποβάλλονται έως την 1η Ιουνίου, εκτός από εκείνες για το πατατόσπορο που διατηρείται στο αγρόκτημα, οι οποίες υποβάλλονται έως την 1η Σεπτεμβρίου. Οι λεπτομέρειες και τα αποτελέσματα όσον αφορά τις καλλιέργειες αφορούν την παραγωγή του προηγούμενου έτους. Οι λεπτομέρειες των γνωστοποιήσεων αυτών υποβάλλονται στην επιτροπή.

Άρθρο 3

(Άρθρο 3 Οδηγίας 98/57/ΕΚ)

Η αρμόδια αρχή μεριμνά ώστε κάθε πιθανολογούμενη εμφάνιση ή διαπιστωμένη παρουσία του οργανισμού στη Χώρα να ανακοινώνεται στις συναρμόδιες Υπηρεσίες της Χώρας.

Άρθρο 4

(Άρθρο 4 Οδηγίας 98/57/ΕΚ)

1. Σε κάθε περίπτωση πιθανολογούμενης εμφάνισης, η αρμόδια αρχή εξασφαλίζει τη διεξαγωγή επίσημης ή υπό επίσημη εποπτεία εργαστηριακής δοκιμής, είτε, για το καταχωρημένο φυτικό υλικό, με τη σχετική μέθοδο του παραρτήματος ΙΙ και σύμφωνα με τους όρους του παραρτήματος ΙΙΙ, σημείο 1, είτε, στις άλλες περιπτώσεις, με οποιαδήποτε άλλη επισήμως εγκεκριμένη μέθοδο, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ή να διαψευσθεί η πιθανολογούμενη εμφάνιση. Σε περίπτωση επιβεβαίωσης, εφαρμόζονται οι απαιτήσεις του παραρτήματος ΙΙΙ, σημείο 2.

2. Μέχρις ότου επιβεβαιωθεί ή διαψευσθεί η πιθανολογούμενη εμφάνιση σύμφωνα με την παράγραφο 1, στις περιπτώσεις πιθανολογούμενης εμφάνισης κατά τις οποίες, είτε:

i) παρατηρήθηκαν διαγνωστικά συμπτώματα των ασθενειών που προκαλούνται από τον οργανισμό και ελήφθη θετικό αποτέλεσμα από τη δοκιμή ταχείας διαλογής που αναφέρεται στο παράρτημα ΙΙ, τμήμα Ι, σημείο 1 και τμήμα ΙΙ, είτε

ii) ελήφθη θετικό αποτέλεσμα από δοκιμή ή δοκιμές διαλογής, όπως ορίζεται στο παράρτημα ΙΙ, τμήμα Ι, σημείο 2 και τμήμα ΙΙΙ,

α) απαγορεύεται η διακίνηση όλων των φυτών και κονδύλων από όλες τις καλλιέργειες, παρτίδες ή αποστολές από τις οποίες έχουν ληφθεί τα δείγματα, εκτός εάν διακινούνται υπό τον έλεγχό τους και με την προϋπόθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν ενέχουν εμφανή κίνδυνο μετάδοσης του οργανισμού·

β) λαμβάνονται μέτρα προς εξακρίβωση της προέλευσης της πιθανολογούμενης εμφάνισης·

γ) λαμβάνονται κατάλληλα πρόσθετα προληπτικά μέτρα, βάσει του επιπέδου του εκτιμώμενου κινδύνου, ιδίως σε σχέση με την παραγωγή του καταχωρημένου φυτικού υλικού και τη διακίνηση παρτίδων πατατόσπορου διαφορετικών από εκείνες που αναφέρονται στο στοιχείο α και που παράγονται στον τόπο παραγωγής από τον οποίο έχουν ληφθεί τα δείγματα που αναφέρονται στο στοιχείο α, για την πρόληψη της μετάδοσης του οργανισμού.

3. Στις περιπτώσεις πιθανολογούμενης εμφάνισης κατά τις οποίες υπάρχει κίνδυνος μόλυνσης του καταχωρημένου φυτικού υλικού ή του επιφανειακού νερού από ή σε άλλο κράτος μέλος, η αρμόδια αρχή γνωστοποιεί αμέσως, ανάλογα με την έκταση του κινδύνου, τις λεπτομέρειες της πιθανολογούμενης εμφάνισης στο άλλο οικείο κράτος μέλος και συνεργάζεται κατάλληλα. Εάν η αρμόδια αρχή λάβει σχετική τέτοια γνωστοποίηση από άλλο Κράτος μέλος, λαμβάνει προληπτικά μέτρα σύμφωνα με την παράγραφο 2, σημείο ii στοιχείο γ και, ανάλογα με την περίπτωση, αναλαμβάνει κάθε περαιτέρω δράση, σύμφωνα με τις παραγράφους 1 και 2.

Άρθρο 5

(Άρθρο 5 Οδηγίας 98/57/ΕΚ)

1. Εάν από την επίσημη ή υπό επίσημη εποπτεία εργαστηριακή δοκιμή, είτε, για το καταχωρημένο φυτικό υλικό, με τη σχετική μέθοδο του παραρτήματος ΙΙ, είτε, στις άλλες περιπτώσεις, με άλλη επισήμως εγκεκριμένη μέθοδο, επιβεβαιωθεί η παρουσία του οργανισμού σε δείγμα ληφθέν σύμφωνα με το παρών Διάταγμα, η αρμόδια αρχή αφού λάβει υπόψη τις ορθές επιστημονικές αρχές, τη βιολογία του οργανισμού και το συγκεκριμένο σύστημα παραγωγής, εμπορίας και μεταποίησης των ξενιστών του οργανισμού:

α) για το καταχωρημένο φυτικό υλικό:

i) διενεργεί ελέγχους για τον προσδιορισμό της έκτασης και της ή των πρωτογενών εστιών μόλυνσης σύμφωνα με τις διατάξεις του παραρτήματος IV, και διενεργεί πρόσθετες δοκιμές σύμφωνα με το άρθρο 4 παράγραφος 1, τουλάχιστον σε όλα τα κλωνικώς σχετιζόμενα αποθέματα πατατόσπορου και

ii) χαρακτηρίζει ως μολυσμένο το καταχωρημένο φυτικό υλικό, τις αποστολές και /ή τις παρτίδες από τις οποίες

λήφθηκε το δείγμα, καθώς και τα μηχανήματα, τα οχήματα, τους περιέκτες, τις αποθήκες ή τα τμήματα αυτών και κάθε άλλο αντικείμενο, συμπεριλαμβανομένων των υλικών συσκευασίας που χρησιμοποιήθηκαν για το καταχωρημένο φυτικό υλικό από το οποίο έχει ληφθεί το δείγμα· επίσης, χαρακτηρίζει ως μολυσμένους, κατά περίπτωση, τους αγρούς, τις μονάδες προστατευόμενης φυτικής παραγωγής και τους τόπους παραγωγής από τους οποίους συγκομίστηκε το καταχωρημένο φυτικό υλικό και έχει ληφθεί το δείγμα· για τα δείγματα που λήφθηκαν κατά τη βλαστική περίοδο, πρέπει να χαρακτηρίζονται ως μολυσμένοι οι αγροί, οι τόποι παραγωγής και, κατά περίπτωση, οι μονάδες προστατευόμενης φυτικής παραγωγής από τις οποίες λήφθηκε το δείγμα και

iii) προσδιορίζει, σύμφωνα με τις διατάξεις του παραρτήματος V, σημείο 1, την έκταση της πιθανής μόλυνσης δια επαφής πριν ή μετά την συγκομιδή ή μέσω σχέσης της διαδικασίας παραγωγής, άρδευσης ή ψεκασμού ή μέσω κλωνικής σχέσης με τη συγκεκριμένη μόλυνση και

iv) οριοθετεί μία ζώνη βάσει του χαρακτηρισμού της μόλυνσης που αναφέρεται στο σημείο ii, του προσδιορισμού της έκτασης της πιθανής μόλυνσης που αναφέρεται στο σημείο iii, και της πιθανής μετάδοσης του οργανισμού, σύμφωνα με τις διατάξεις του σημείου 2, στοιχείο i του παραρτήματος V·

β) για καλλιέργειες ξενιστών άλλων από εκείνους που αναφέρονται στο στοιχείο α κατά τις οποίες η παραγωγή του καταχωρημένου φυτικού υλικού διατρέχει κίνδυνο:

i) διενεργεί ελέγχους σύμφωνα με το στοιχείο α, σημείο i και

ii) χαρακτηρίζει ως μολυσμένους τους ξενιστές του οργανισμού από τους οποίους έχει ληφθεί το δείγμα και

iii) προσδιορίζει την έκταση της πιθανής μόλυνσης και οριοθετεί μία ζώνη σύμφωνα με το εδάφιο α, σημεία iii και iv αντίστοιχα, σε σχέση με την παραγωγή του καταχωρημένου φυτικού υλικού·

γ) για το επιφανειακό νερό (συμπεριλαμβανομένων των απορρίψεων υγρών αποβλήτων από χώρους βιομηχανικής μεταποίησης ή συσκευασίας του καταχωρημένου φυτικού υλικού) και για τα άγρια φυτά της οικογενείας των σολανωδών, από τα οποία η παραγωγή του καταχωρημένου φυτικού υλικού διατρέχει κίνδυνο μέσω της άρδευσης ή του ψεκασμού με τα επιφανειακά ύδατα ή λόγω πλημμύρας από το επιφανειακό νερό:

i) διενεργεί ελέγχους, συμπεριλαμβανομένης της επίσημης μελέτης, σε κατάλληλες στιγμές, δειγμάτων από επιφανειακό νερό και, εφόσον υπάρχουν, από άγρια φυτά της οικογένειας των σολανωδών προκειμένου να προσδιοριστεί ή έκταση της μόλυνσης και

ii) χαρακτηρίζει ως μολυσμένο το επιφανειακό νερό από το οποίο έχει ληφθεί το ή τα δείγματα λαμβάνοντας υπόψη την έκταση της μόλυνσης και τους ελέγχους που διεξάγονται σύμφωνα με το σημείο i και

iii) προσδιορίζει την έκταση της πιθανής μόλυνσης και οριοθετεί μια ζώνη βάσει του χαρακτηρισμού της μόλυνσης που αναφέρεται στο σημείο ii, και της πιθανής διάδοσης του οργανισμού, λαμβάνοντας υπόψη τις διατάξεις του σημείου 1 και του σημείου 2, στοιχείο ii του παραρτήματος V.

2. Η αρμόδια αρχή γνωστοποιεί αμέσως, σύμφωνα με τις διατάξεις του παραρτήματος V, σημείο 3, στις αρμόδιες αρχές των άλλων κρατών μελών και την Επιτροπή κάθε μόλυνση που προσδιορίζεται βάσει της παραγράφου 1, στοιχείο α, σημείο ii και της παραγράφου 1, στοιχείο γ, σημείο ii, καθώς και τις λεπτομέρειες της οριοθέτησης ζώνης βάσει της παραγράφου 1, στοιχείο α, σημείο iv και, κατά περίπτωση, της παραγράφου 1 στοιχείο γ, σημείο iii. Οι λεπτομέρειες της γνωστοποίησης δυνάμει της παρούσας παραγράφου υποβάλλονται στην επιτροπή.

Ταυτόχρονα, η αρμόδια αρχή υποβάλλει στην επιτροπή την πρόσθετη γνωστοποίηση που προβλέπεται στο σημείο 4 του παραρτήματος V. Οι λεπτομέρειες της γνωστοποίησης δυνάμει του παρόντος εδαφίου υποβάλλονται αμέσως στα μέλη της επιτροπής.

3. Βάσει της γνωστοποίησης σύμφωνα με την παράγραφο 2 και των γνωστοποιημένων στοιχείων, οι αρμόδιες αρχές των άλλων κρατών μελών που αναφέρονται στην γνωστοποίηση διενεργούν έλεγχο σύμφωνα με την παράγραφο 1, στοιχείο α, σημείο i και, κατά περίπτωση, την παράγραφο 1, στοιχείο γ, σημείο i και αναλαμβάνουν ενδεχομένως περαιτέρω δράση, σύμφωνα με τις παραγράφους 1 και 2.

Άρθρο 6

(Άρθρο 6 Οδηγίας 98/57/ΕΚ)

1. Το καταχωρημένο φυτικό υλικό που έχει χαρακτηριστεί ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α, σημείο ii, δεν μπορεί να φυτεύεται και πρέπει, υπό τον έλεγχο και την έγκριση της αρμόδιας αρχής, να υπόκειται σε μια από τις διατάξεις του παραρτήματος VI, σημείο 1 κατά τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού.

2. Απαγορεύεται η φύτευση του καταχωρημένου φυτικού υλικού που έχει χαρακτηρισθεί ως πιθανώς μολυσμένο βάσει του άρθρου 5, παράγραφος 1, στοιχείο α, σημείο iii, και στοιχείο γ, σημείο iii, συμπεριλαμβανομένου του καταχωρημένου φυτικού υλικού για το οποίο έχει εντοπιστεί κίνδυνος και το οποίο έχει παραχθεί σε τόπους παραγωγής που έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανώς μολυσμένοι σύμφωνα με το άρθρο 5, παράγραφος 1, στοιχείο α, σημείο iii, και πρέπει υπό τον έλεγχο της αρμόδιας αρχής, να χρησιμοποιείται ή να διατίθεται καταλλήλως, όπως ορίζεται στο παράρτημα VI, σημείο 2, κατά τρόπο ώστε να διασφαλίζεται ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού.

3. Τα μηχανήματα, τα οχήματα, οι περιέκτες, οι αποθήκες ή τα τμήματα αυτών, και κάθε άλλο αντικείμενο, συμπεριλαμβανομένων των υλικών συσκευασίας, που έχουν χαρακτηρισθεί μολυσμένα βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α, σημείο ii ή που έχουν χαρακτηρισθεί ως πιθανώς μολυσμένα βάσει του άρθρου 5, παράγραφος 1, στοιχείο α, σημείο iii και στοιχείο γ, σημείο iii, πρέπει να καταστρέφονται ή να απολυμαίνονται με κατάλληλες μεθόδους όπως ορίζεται στο παράρτημα VI, σημείο 3. Μετά την απολύμανση, τα αντικείμενα αυτά παύουν να θεωρούνται μολυσμένα.

4. Με την επιφύλαξη των μέτρων που εφαρμόζονται σύμφωνα με τις παραγράφους 1, 2 και 3, για τη ζώνη που οριοθετείται βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α σημείο iv και στοιχείο γ, σημείο iii, εφαρμόζονται ορισμένα μέτρα, όπως καθορίζεται στο παράρτημα VI, σημεία 4.1. και 4.2. Οι λεπτομέρειες των μέτρων αυτών γνωστοποιούνται ετησίως στα άλλα κράτη μέλη και την Επιτροπή. Οι λεπτομέρειες της γνωστοποίησης αυτής υποβάλλονται στην επιτροπή.

Άρθρο 7

(Άρθρο 7 Οδηγίας 98/57/ΕΚ)

Ο πατατόσπορος πρέπει να πληρεί τις απαιτήσεις του Π.Δ. 332 /29-8-1995 (178Α) και να προέρχεται απευθείας από υλικό πατάτας το οποίο παράγεται στο πλαίσιο επισήμως εγκεκριμένου προγράμματος και το οποίο έχει κριθεί απαλλαγμένο από τον οργανισμό μετά από επίσημη ή υπό επίσημη εποπτεία δοκιμή με τη σχετική μέθοδο του παραρτήματος ΙΙ.

Η προαναφερόμενη δοκιμή πραγματοποιείται:

α) στις περιπτώσεις που έχουν επιβεβαιωθεί ευρήματα του οργανισμού στην παραγωγή πατατόσπορου,

i) με δοκιμή των προηγουμένων γενεών, συμπεριλαμβανομένης της αρχικής κλωνικής επιλογής, και με συστηματική δοκιμή των βασικών κλώνων πατατόσπορου, ή

ii) στις περιπτώσεις κατά τις οποίες έχει αποδειχθεί ότι δεν υπάρχει κλωνική σχέση, με δοκιμή όλων των βασικών κλώνων πατατόσπορου ή προηγούμενων γενεών, συμπεριλαμβανομένης της αρχικής κλωνικής επιλογής·

β) στις λοιπές περιπτώσεις, είτε σε κάθε φυτό της αρχικής κλωνικής επιλογής, ή σε αντιπροσωπευτικά δείγματα του βασικού πατατόσπορου ή των προηγουμένων γενεών.

Άρθρο 8

(Άρθρο 8 Οδηγίας 98/57/ΕΚ)

Απαγορεύεται η κατοχή και η διακίνηση του οργανισμού.

Άρθρο 9

(Άρθρο 9 Οδηγίας 98/57/ΕΚ)

Με την επιφύλαξη των διατάξεων του Π.Δ. 332/29-8-95 (178Α), η αρμόδια αρχή επιτρέπει παρεκκλίσεις από τα μέτρα που αναφέρονται στα άρθρα 6 και 8 του παρόντος Διατάγματος, σύμφωνα με τις διατάξεις του Π.Δ. 141/22-5-98 (108Α) για πειραματικούς ή επιστημονικούς σκοπούς, καθώς και για εργασίες επιλογής ποικιλιών.

Άρθρο 10

(Άρθρο 10 Οδηγίας 98/57/ΕΚ)

Η αρμόδια αρχή λαμβάνει, όσον αφορά τη παραγωγή, πρόσθετα ή αυστηρότερα μέτρα που απαιτούνται για την καταπολέμηση του οργανισμού ή για την πρόληψη της μετάδοσής του, υπό την προϋπόθεση ότι τα μέτρα αυτά είναι σύμφωνα με το Π.Δ. 332/29-8-95 (178Α).

Οι λεπτομέρειες των μέτρων αυτών γνωστοποιούνται στα άλλα κράτη μέλη και την Επιτροπή. Οι λεπτομέρειες της γνωστοποίησης αυτής υποβάλλονται στην Επιτροπή.

Άρθρο 11

Παραρτήματα

Κατωτέρω παρατίθενται τα Παραρτήματα Ι, ΙΙ, ΙΙΙ, ΙV, V, VI και VII που αποτελούν αναπόσπαστο μέρος του παρόντος και έχουν ως εξής:

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΤΜΗΜΑ Ι

Κατάλογος ξενιστών του Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al. όπως ορίζονται στο άρθρο 1.

Φυτά, (συμπεριλαμβανομένων των κονδύλων) εκτός από τον πραγματικό σπόρο του Solanum tuberosum L.

πατάτα

Φυτά, εκτός των καρπών και των σπόρων του Lycopersicon lycopersicum (L.) Karsten ex Farw.

τομάτα

ΤΜΗΜΑ ΙΙ

Μελέτες

1. Οι επίσημες μελέτες που αναφέρονται στο άρθρο 2 παράγραφος 2, στοιχείο α), διεξάγονται βάσει της βιολογίας του οργανισμού και των συγκεκριμένων συστημάτων παραγωγής και πρέπει να περιλαμβάνουν:

i) όσον αφορά την πατάτα,

- σε κατάλληλες περιόδους, μακροσκοπική επιθεώρηση των καλλιεργούμενων φυτών, ή/και δειγματοληψία από τους σπόρους και άλλες πατάτες κατά τη βλαστική περίοδο ή στην αποθήκη. Τα δείγματα αυτά υποβάλλονται σε επίσημο ή υπό επίσημη εποπτεία μακροσκοπικό έλεγχο κομμένων κονδύλων,

και

- στην περίπτωση του πατατόσπορου και, κατά περίπτωση, για άλλες πατάτες, επίσημες ή υπό επίσημη εποπτεία εργαστηριακές δοκιμές με τη μέθοδο του παραρτήματος ΙΙ,

ii) όσον αφορά την τομάτα,

- μακροσκοπική επιθεώρηση, σε κατάλληλες περιόδους, τουλάχιστον των καλλιεργούμενων φυτών που προορίζονται για μεταφύτευση για επαγγελματική χρήση.

2. Η γνωστοποίηση των επίσημων επιθεωρήσεων που αναφέρονται στο άρθρο 2, παράγραφος 3, πρέπει να περιλαμβάνει:

i) στην περίπτωση των επιθεωρήσεων για την πατάτα,

- την εκτιμώμενη συνολική καλλιεργούμενη έκταση, σε στρέμματα, πατατόσπορου και άλλης πατάτας,

- τη διαστρωμάτωση ανά κατηγορία πατατοσπόρου και πατάτας εμπορίου, και, κατά περίπτωση, ανά περιοχή,

- τον αριθμό και το χρόνο λήψης των δειγμάτων,

- τον αριθμό μακροσκοπικών ελέγχων στον αγρό,

- τον αριθμό (και το μέγεθος του δείγματος) των μακροσκοπικών ελέγχων κονδύλων,

ii) στην περίπτωση των επιθεωρήσεων, τουλάχιστον, για τα καλλιεργούμενα φυτά τομάτας που προορίζονται για μεταφύτευση για επαγγελματική χρήση,

- τον εκτιμώμενο συνολικό αριθμό φυτών,

- τον αριθμό των μακροσκοπικών ελέγχων,

iii) στην περίπτωση των επιθεωρήσεων που αφορούν ξενιστές άλλους από την πατάτα και την τομάτα, συμπεριλαμβανομένων των άγριων φυτών της οικογένειας των σολανωδών,

- το είδος,

- τον αριθμό και το χρόνο λήψης των δειγμάτων,

- την περιοχή/ποτάμι δειγματοληψίας, κατά περίπτωση,

- τη μέθοδο ανάλυσης,

iv) στην περίπτωση των επιθεωρήσεων σχετικά με το νερό και τις απορρίψεις υγρών αποβλήτων από εγκαταστάσεις βιομηχανικής μεταποίησης ή συσκευασίας,

- τον αριθμό και το χρόνο λήψης των δειγμάτων,

- την περιοχή/το ποτάμι/την τοποθεσία των εγκαταστάσεων δειγματοληψίας, κατά περίπτωση,

- τη μέθοδο ανάλυσης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

ΣΧΗΜΑ ΔΟΚΙΜΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ, ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ RALSTONIA SOLANACEARUM (SMITH) YABUUCHI ET AL.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ

Στο παρόν σχήμα περιγράφονται οι διάφορες διαδικασίες για:

i) τη διάγνωση της καστανής σήψης σε κονδύλους πατάτας και της βακτηριακής μάρανσης σε φυτά πατάτας και τομάτας,

ii) την ανίχνευση του Ralstonia solanacearum σε δείγματα κονδύλων πατάτας,

iii) την αναγνώριση του Ralstonia solanacearum.

Στα προσαρτήματα παρέχονται λεπτομέρειες για την παρασκευή των χρησιμοποιουμένων για τις δοκιμές υλικών, δηλαδή θρεπτικών υποστρωμάτων, ρυθμιστικών διαλυμάτων, διαλυμάτων, αντιδραστηρίων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

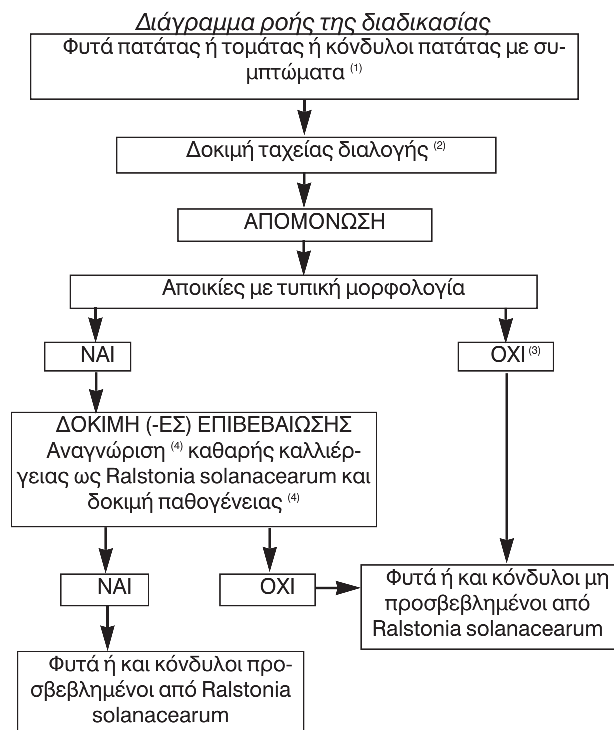
ΤΜΗΜΑ Ι

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ

1. Διάγνωση της καστανής σήψης σε κονδύλους πατάτας και της βακτηριακής μάρανσης σε φυτά πατάτας και τομάτας

Η περιγραφόμενη διαδικασία εξέτασης προορίζεται για κονδύλους πατάτας που παρουσιάζουν τυπικά συμπτώματα ή γεννούν υπόνοιες για ύπαρξη καστανής σήψης και για φυτά πατάτας και τομάτας που παρουσιάζουν τυπικά συμπτώματα ή γεννούν υπόνοιες για ύπαρξη βακτηριακής μάρανσης. Η διαδικασία περιλαμβάνει μία δοκιμή ταχείας διαλογής, απομόνωση του παθογόνου αιτίου από μολυσμένο αγγειώδη ιστό σε διαγνωστικά υλικά και, σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, αναγνώριση της καλλιέργειας ως Ralstonia solanacearum.

Διάγραμμα ροής της διαδικασίας



Παραπομπές διαγράμματος:

(1) Περιγραφή των συμπτωμάτων δίδεται στο τμήμα ΙΙ.1.

(2) Οι δοκιμές ταχείας διαλογής διευκολύνουν την προκαταρκτική διάγνωση.

Κατάλληλες δοκιμές είναι:

- η δοκιμή εκκρίσεων του αγγειώδους ιστού του στελέχους (τμήμα ΙΙ. 2),
- η δοκιμή για πολύ -β-υδροξυβουτυρικά κοκκία (τμήμα ΙΙ.2),
- η δοκιμή IF (τμήμα ΙΙΙ.2),
- η δοκιμή ELISA (τμήμα ΙΙΙ.3),
- η δοκιμή PCR (τμήμα ΙΙΙ. 4).

(3) Αν και η απομόνωση του παθογόνου αιτίου με τη διαδικασία διαδοχικών αραιώσεων επί στερεού υποστρώματος από ιστούς με τυπικά συμπτώματα είναι άμεση, η καλλιέργεια μπορεί να αποτύχει αν βρισκόμαστε σε προκεχωρημένα στάδια μολύνσεως. Σαπροφυτικά βακτήρια που αναπτύσσονται σε προσβεβλημένο ιστό μπορεί να επικαλύψουν ή να εμποδίσουν την ανάπτυξη του παθογό-

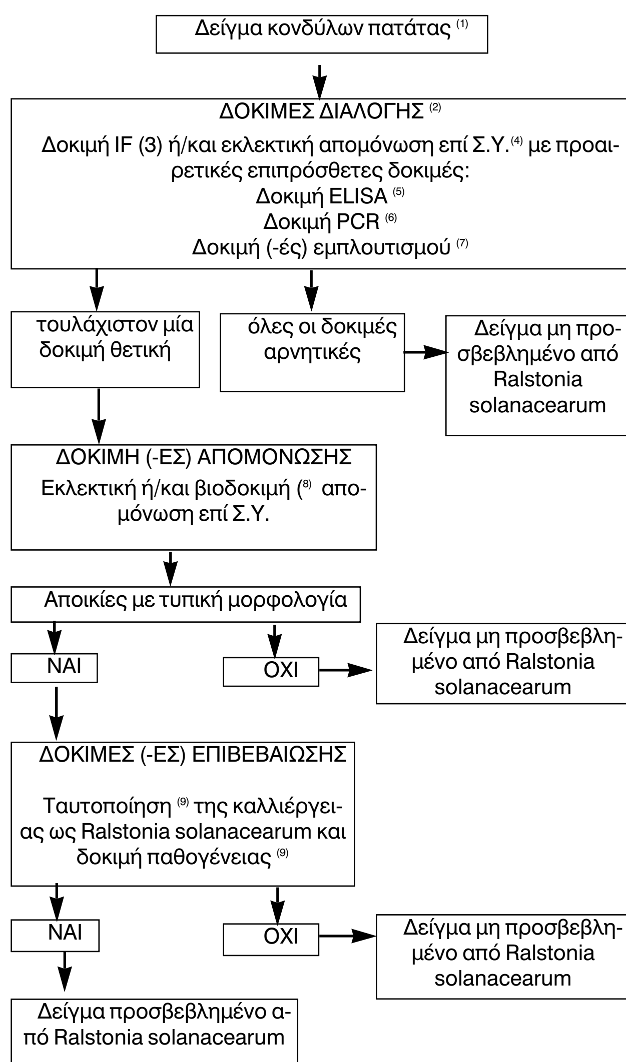
νου στο υλικό απομόνωσης. Εάν η δοκιμή απομόνωσης είναι αρνητική, αλλά υπάρχουν τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας, τότε η διαδικασία απομόνωσης πρέπει να επαναληφθεί, κατά προτίμηση με εκλεκτική απομόνωση επί στερεού υποστρώματος.

(4) Αξιόπιστη ταυτοποίηση μίας καθαρής καλλιέργειας Ralstonia solanacearum επιτυγχάνεται με μία τουλάχιστον από τις δοκιμές που παρατίθενται στο τμήμα ΙΙ.4.1. σε συνδυασμό με μία δοκιμή παθογένειας (τμήμα ΙΙ.4.3.). Ο προσδιορισμός του στελέχους είναι προαιρετικός, συνιστάται όμως να γίνεται σε κάθε νέο περιστατικό.

2. Ανίχνευση και ταυτοποίηση του Ralstonia solanacearum σε δείγματα κονδύλων πατάτας.

Η διαδικασία αποσκοπεί στην ανίχνευση μολύνσεων σε λανθάνουσα μορφή σε κονδύλους πατάτας με μία ή, κατά προτίμηση περισσότερες δοκιμές διαλογής οι οποίες, εφόσον είναι θετικές επιβεβαιώνονται με την απομόνωση του παθογόνου οργανισμού, ακολουθεί δε, στην περίπτωση απομόνωσης τυπικών αποικιών, ταυτοποίηση μιας καθαρής καλλιέργειας ως καλλιέργειας Ralstonia solanacearum.

Διάγραμμα ροής της διαδικασίας



Παραπομπές διαγράμματος:

(1) Μ έ γ ε θ ο ς δ ε ί γ μ α τ ο ς

Το κανονικό μέγεθος δείγματος είναι 200 κόνδυλοι. Η δοκιμασία όμως μπορεί να εφαρμοσθεί και για δείγματα μικρότερα των 200 κονδύλων.

(2) Δ ο κ ι μ ή (ές) α ν ί χ ν ε υ σ η ς

Για την ανίχνευση του Ralstonia solanacearum μπορεί να μην αρκεί από πλευράς ευαισθησίας ή αξιοπιστίας πραγματοποίηση μίας μόνον δοκιμής σε ένα δείγμα. Συνεπώς, συνιστάται να πραγματοποιούνται περισσότερες από μία δοκιμές, οι οποίες θα πρέπει να βασίζονται κατά προτίμηση σε διαφορετικές βιολογικές αρχές.

(3) Δ ο κ ι μ ή α ν ο σ ο φ θ ο ρ ι σ μ ο ύ (IF)

Η δοκιμή ανοσοφθορισμού είναι μία καλά καθιερωμένη δοκιμή διαλογής. Το γεγονός αυτό συνιστά πλεονέκτημα σε σχέση με άλλες δοκιμές που δεν έχουν ακόμη αναπτυχθεί πλήρως ή δεν έχει ακόμη επιβεβαιωθεί η εγκυρότητά τους. Η δοκιμή αυτή χρησιμοποιείται για πολλά άλλα καθορισμένα βακτήρια, όπως το Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus.Βάσει των καθορισμένων παραμέτρων ανάγνωσης της μεθόδου, αυτή είναι μία ευαίσθητη δοκιμή {όριο ευαισθησίας 10^3 - 10^4 κύτταρα ανά ml εκχυλίσματος ιζήματος πατάτας}.

Η ποιότητα του αντιορού αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της δοκιμής. Αποδεκτοί είναι μόνον αντιοροί με υψηλό τίτλο (κατ' ελάχιστον 2000 για τον αρχικό αντιορό), όλες δε οι δοκιμές πρέπει να πραγματοποιούνται με τον τίτλο του αντιορού ή μία αραίωση κάτω του τίτλου. Προτιμάται η έμμεση μέθοδος. Η άμεση μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί εάν το επίπεδο ευαισθησίας και εξειδίκευσης της δοκιμής είναι ισοδύναμο με εκείνο της έμμεσης μεθόδου.

Η δοκιμή IF έχει το πλεονέκτημα της υποκειμενικής ερμηνείας της μορφολογίας χρώσεως των κυττάρων και της έντασης του φθορισμού, χαρακτηριστικά που παρέχουν στοιχεία σχετικά με την εξειδίκευση της αντίδρασης. Αποτελεί σύνηθες φαινόμενο η εμφάνιση ειδικής θετικής αντίδρασης (cross-reaction) ορολογικά σχετιζομένων βακτηρίων, που προέρχονται από το έδαφος ή σχετίζονται με ιστούς πατάτας και έχουν μορφολογία κυττάρων εκείνη του Ralstonia solanacearum. Η δοκιμή IF μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως η αποκλειστική δοκιμή διαλογής, αν και σε περιπτώσεις υποψίας εκλεκτικών αντιδράσεων μπορεί να γίνει μια επιπρόσθετη δοκιμή διαλογής που βασίζεται σε διαφορετική βιολογική αρχή. Σ' αυτές τις περιπτώσεις η πιο κατάλληλη δοκιμή είναι η εκλεκτική απομόνωση επί στερεού θρεπτικού υποστρώματος.

(4) Ε κ λ ε κ τ ι κ ή α π ο μ ό ν ω σ η ε π ί σ τ ε ρ ε ο ύ υ π ο σ τ ρ ώ μ α τ ο ς.

Με το τροποποιημένο υλικό SMSA και τη μεθοδολογία εξέτασης που εξειδικεύεται σ' αυτή τη μέθοδο, αυτή συνιστά μία ευαίσθητη και εκλεκτική δοκιμή για το Ralstonia solanacearum. Το αποτέλεσμα λαμβάνεται 3-6 ημέρες μετά την προετοιμασία του δείγματος. Το παθογόνο λαμβάνεται απ ευθείας στην καλλιέργεια και μπορεί να ταυτοποιηθεί εύκολα. Για την πλήρη εκμετάλλευση των δυνατοτήτων της, η δοκιμή απαιτεί να γίνεται προσεκτική προετοιμασία των τεμαχίων ιστού λαμβανομένων από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου για την αποφυγή δευτερογενών βακτηρίων σχετιζομένων με τους κονδύλους πατάτας που είναι ανταγωνιστές του Ralstonia solanacearum στο θρεπτικό υπόστρωμα και μπορούν να

επηρεάζουν την ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού.

Ορισμένα βακτηριακά στελέχη μπορεί να αναπτυχθούν πολύ λίγο καθώς τα συστατικά του υποστρώματος μπορεί να επηρεάσουν το οργανισμό-στόχο. Χρειάζεται επίσης προσοχή ώστε το Ralstonia solanacearum να διαφοροποιείται από τυχόν άλλα βακτήρια που μπορεί να αναπτυχθούν στο θρεπτικό υπόστρωμα. Η εκλεκτική απομόνωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αποκλειστική δοκιμή διαλογής με την προϋπόθεση ότι σε περίπτωση που υπάρχει υποψία παρεμπόδισης της ανάπτυξης του Ralstonia solanacearum από άλλα βακτήρια επί των τρυβλίων, και προκύπτει αρνητικό αποτέλεσμα, το δείγμα επανεξετάζεται χρησιμοποιώντας διαφορετική δοκιμή για την επικύρωση ή απόρριψη της διάγνωσης. Στις περιπτώσεις αυτές, η δοκιμή IF είναι η καταλληλότερη.

(5) Δ ο κ ι μ ή ELISA

Η δοκιμή ELISA είναι εν γένει λιγότερο ευαίσθητη από τη δοκιμή IF (όριο ευαισθησίας 10^4-10^5 κύτταρα ανά ml εκχυλίσματος ιζήματος πατάτας). Η δοκιμή είναι φθηνή και γρήγορη, είναι όμως εν γένει πιο επιρρεπής στην εμφάνιση εσφαλμένων θετικών (μη ειδικών θετικών αντιδράσεων) αποτελεσμάτων και εσφαλμένων αρνητικών (παρεμπόδιση από φαινολικά μόρια στο εκχύλισμα πατάτας) αποτελεσμάτων. Οι απαιτήσεις από πλευράς εξειδίκευσης του αντιορού είναι εξαιρετικά μεγάλες. Η δοκιμή ELISA δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αποκλειστική δοκιμή εξέτασης.

(6) Δ ο κ ι μ ή PCR (α λ υ σ ι δ ω τ ή α ν τ ί δ ρ α σ η π ο λ υ μ ε ρ ά σ η ς).

Η ανίχνευση με PCR είναι πολύ ευαίσθητη. Αν και σε ένα δείγμα είναι δυνατόν να ανιχνευθεί ακόμη και ένα μεμονωμένο μόριο DNA, η δοκιμή παρεμποδίζεται εύκολα από διάφορα συστατικά του εκχυλίσματος του φυτού ή του κονδύλου που οδηγούν σε εσφαλμένο αρνητικό αποτέλεσμα. Ορισμένες καλλιεργούμενες ποικιλίες πατάτας περιέχουν περισσότερους παρεμποδιστές από άλλες. Χρειάζεται επομένως οι παρεμποδιστές αυτοί να απομακρύνονται. Η παρεμπόδιση μπορεί να μειωθεί με αραίωση αλλά έτσι αραιώνονται και οι πληθυσμοί του Ralstonia solanacearum. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται σε όλα τα στάδια προετοιμασίας του δείγματος και της δοκιμής για να αποκλείεται τυχόν μόλυνση που θα μπορούσε να οδηγήσει σε εσφαλμένα θετικά αποτελέσματα. Γι' αυτό η δοκιμή PCR δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως η αποκλειστική δοκιμή εξέτασης.

(7) Δ ο κ ι μ ή ε μ π λ ο υ τ ι σ μ ο ύ

Επωάζοντας δείγματα εκχυλίσματος ιζήματος πατάτας σε ένα ημιεκλεκτικό θρεπτικό ζωμό, όπως ο τροποποιημένος SMSA, μπορούμε να επιτύχουμε τον πολλαπλασιασμό του Ralstonia solanacearum. Το σημαντικότερο ίσως στην περίπτωση αυτή είναι ότι έτσι αραιώνονται και οι εν δυνάμει παρεμποδιστές στις δοκιμές ELISA ή PCR. Ετσι, το Ralstonia solanacearum σε εμπλουτισμένο ζωμό μπορεί να ανιχνευθεί με τις μεθόδους IF, ELISA και PCR. Συνιστούμε να μη γίνεται άμεση απομόνωση επί στερεού υποστρώματος από τους εμπλουτισμένους ζωμούς. Οι μέθοδοι αυτές εμπλουτισμού δεν έχουν δοκιμαστεί επισταμένως. Περιλαμβάνονται στο παρόν γιατί έχουν καλές προοπτικές. Εντούτοις, λόγω της σχετικής έλλειψης εμπειριών, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αποκλειστικές μέθοδοι ανίχνευσης.

(8) Β ι ο δ ο κ ι μ ή

Η βιοδοκιμή χρησιμοποιείται για την απομόνωση του Ralstonia solanacearum από ιζήματα εκχυλισμάτων πατάτας κατόπιν εκλεκτικού εμπλουτισμού σε ένα φυτό ξενιστή και μπορεί να γίνει σε φυτά τομάτας ή μελιτζάνας. Η δοκιμή απαιτεί άριστες συνθήκες επωάσεως όπως καθορίζονται στη μέθοδο αυτή, κατά πάσα πιθανότητα, τυχόν βακτήρια που δρουν παρεμποδιστικά έναντι του Ralstonia solanacearum σε SMSA δεν δρουν παρεμβατικά στη δοκιμή αυτή.

(9) Δ ο κ ι μ ή (-ές) ε π ι β ε β α ί ω σ η ς

Αξιόπιστη ταυτοποίηση καθαρής καλλιέργειας Ralstonia solanacearum επιτυγχάνεται με μία τουλάχιστον από τις δοκιμές που παρατίθενται στο τμήμα II.4.1 σε συνδυασμό με μία δοκιμή παθογένειας (τμήμα II.4.3) Ο χαρακτηρισμός του στελέχους είναι προαιρετικός, αλλά συστήνεται για κάθε νέα περίπτωση.

.

ΤΜΗΜΑ ΙΙ
ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΚΑΣΤΑΝΗΣ ΣΗΨΗΣ ΣΕ ΚΟΝΔΥΛΟΥΣ ΠΑΤΑΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΜΑΡΑΝΣΗΣ ΣΕ ΦΥΤΑ ΠΑΤΑΤΑΣ ΚΑΙ ΤΟΜΑΤΑΣ

1. Συμπτώματα

1.1. Σ υ μ π τ ώ μ α τ α σ τ η ν π α τ ά τ α

Στο φυτό της πατάτας: Στο αρχικό στάδιο της ασθένειας εμφανίζεται μαρασμός των φύλλων προς την κορυφή του φυτού σε υψηλές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια της ημέρας με ανάληψη κατά τη διάρκεια της νύχτας. Σύντομα ο μαρασμός καθίσταται μη αναστρέψιμος και οδηγεί στο θάνατο του φυτού. Ο αγγειώδης ιστός σε εγκαρσίως κομμένα στελέχη από μαραμένα φυτά μπορεί να γίνει καστανός, από δε την κομμένη επιφάνεια εκρέει, ή μπορεί να εξέλθει εύκολα συμπιέζοντάς την, ένα γαλακτώδες εξίδρωμα. Όταν ένα κομμένο στέλεχος τοποθετηθεί κατακόρυφα μέσα σε νερό, από τις αγγειώδεις δέσμες εκρέουν κλωστές γλοιώδους υγρού.

Στον κόνδυλο της πατάτας: Οι κόνδυλοι πρέπει να κόβονται εγκαρσίως κοντά στο σημείο πρόσφυσης του στολονίου. Στο αρχικό στάδιο της ασθένειας εμφανίζεται ένας υαλώδους όψεως, κίτρινος προς ανοικτό καστανό, μεταχρωματισμός του αγγειώδους δακτυλίου από τον οποίο εκρέει ταυτόχρονα μετά λίγα λεπτά ή μετά από ελαφρά πίεση με τους αντίχειρες στο φλοιό κοντά στην κομμένη επιφάνεια, ένα υπόλευκο εξίδρωμα. Αργότερα, ο αγγειακός μεταχρωματισμός καθίσταται εντονότερα καστανός και η νέκρωση μπορεί να επεκταθεί στον παρεγχυματώδη ιστό. Σε προκεχωρημένα στάδια της ασθένειας, η μόλυνση εκδηλώνεται εξωτερικά από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου και τους οφθαλμούς και εμφανίζονται στην επιδερμίδα ερυθροκάστανες, ελαφρώς βαθουλωμένες κηλίδες από τις οποίες μπορεί να εκρέει βακτηριακό εξίδρωμα προκαλώντας την προσκόλληση σωματιδίων του εδάφους.

1.2. Σ υ μ π τ ώ μ α τ α σ τ η ν τ ο μ ά τ α

Στο φυτό της τομάτας: Το πρώτο ορατό σύμπτωμα είναι η έλλειψη σπαργής στα νεαρά φύλλα. Υπό περιβαλλοντικές συνθήκες που είναι ευνοϊκές για το παθογόνο (θερμοκρασία εδάφους 25°C, ατμόσφαιρα κορεσμένη σε υγρασία), μέσα σε λίγες μέρες εμφανίζεται επιναστία και μαρασμός της μιας πλευράς ή και ολόκληρου του φυτού, στη συνέχεια δε πλήρης κατάρρευση του φυτού. Σε λιγότερο ευνοϊκές συνθήκες (θερμοκρασία εδάφους κάτω

των 21°C), αναπτύσσεται μεγάλος αριθμός τυχαίων ριζών επί του στελέχους. Ενίοτε, κατά μήκος του στελέχους, εμφανίζεται λιποειδές νήμα που αποτελεί ένδειξη της νέκρωσης του αγγειακού συστήματος. Σε εγκάρσιες τομές του στελέχους, από τους καστανόχρωμα μεταχρωματισμένους αγγειακούς ιστούς εκρέουν σταγόνες λευκού ή υποκίτρινου βακτηριακού εξιδρώματος.

2. Δοκιμές ταχείας διαλογής

Οι δοκιμές ταχείας διαλογής διευκολύνουν την προκαταρκτική διάγνωση. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μία ή περισσότερες από τις ακόλουθες δοκιμές:

Δοκιμή εκκρίσεων από το στέλεχος

Η παρουσία του Ralstonia solanacearum σε μαραμένα στελέχη πατάτας μπορεί να εκτιμηθεί με την ακόλουθη απλή προκαταρκτική δοκιμή:

Κόβουμε το στέλεχος πάνω ακριβώς από το έδαφος. Τοποθετούμε την κομμένη επιφάνεια σε ποτήρι ζέσεως με νερό. Λίγο μετά, από τις αγγειώδεις δεσμίδες αρχίζει να τρέχει ταυτόχρονα με μορφή κλωστών ένα βακτηριακό γλοιώδες έκκριμα. Κανένα από τα βακτήρια που προκαλούν αδροβακτηρίωση σε φυτά της πατάτας, δεν εμφανίζει το φαινόμενο αυτό.

Ανίχνευση πολύ-β-υδροξυβουτυρικών (PHB) κοκκίων

Τα κοκκία PHB στα κύτταρα του Ralstonia solanacearum καθίστανται ορατά δια χρώσεως με Nile Blue A ή με Sudan Black B.

Παρασκευάζουμε επίχρισμα του εξιδρώματος ή του αιωρήματος του ιστού σε αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου ή επίχρισμα 48ωρης καλλιέργειας σε YPGA, ή S-PA (προσάρτημα 1 τμήμα ΙΙΙ). Παρασκευάζουμε επίσης επιχρίσματα στελέχους βιοποικιλίας 2, φυλής 3, ως θετικούς μάρτυρες, και αν θεωρηθεί χρήσιμο ένα επίχρισμα ετερολόγου στελέχους, ως αρνητικό μάρτυρα.

Αφήνουμε να ξηρανθούν. Περνάμε μερικές φορές γρήγορα την κάτω πλευρά της αντικειμενοφόρου πλάκας μέσα από φλόγα μέχρι να προσηλωθεί το επίχρισμα.

Δοκιμή Nile Blue

1. Περιλούζουμε το προσηλωμένο επίχρισμα με 1% υδατικό διάλυμα Nile Blue A και το αφήνουμε για επώαση επί 10 λεπτά στους 55°C.

2. Αποστραγγίζουμε το διάλυμα χρώσεως, πλένουμε την πλάκα για λίγο προσεκτικά με ρέον νερό της βρύσης και απομακρύνουμε την περίσσεια του νερού με απορροφητικό χαρτί.

3. Περιλούζουμε το επίχρισμα με 8% υδατικό διάλυμα οξικού οξέος και το αφήνουμε για επώαση επί 1 λεπτό σε θερμοκρασία εργαστηρίου.

4. Ξεπλένουμε ελαφρά με ρέον νερό της βρύσης και το στεγνώνουμε με απορροφητικό χαρτί.

5. Ξαναρίχνουμε μία σταγόνα νερό και τοποθετούμε μία καλυπτρίδα.

6. Εξετάζουμε το χρωσμένο επίχρισμα σε μικροσκόπιο επιφθορισμού στα 450 nm με ελαιοκαταδυτικό φακό σε μεγέθυνση 1000x.

Εφόσον υπάρχουν κοκκία PHB αυτά φθορίζουν με λαμπρό πορτοκαλί χρώμα. Τα κοκκία παρατηρούνται επίσης και σε κανονικό φως για να ελεγχθεί αν είναι ενδοκυτταρικά και αν η κυτταρική μορφολογία είναι η τυπική μορφολογία του Ralstonia solanacearum.

Δοκιμή Sudan Black.

1. Περιλούζουμε το προσηλωμένο επίχρισμα με διάλυμα 0,3% Sudan Black B σε 70% αιθανόλη και το αφήνουμε για επώαση επί 10 λεπτά σε θερμοκρασία εργαστηρίου.

2. Αποστραγγίζουμε το διάλυμα χρώσεως, ξεπλένουμε για λίγο με νερό της βρύσης και απομακρύνουμε την περίσσεια του νερού με απορροφητικό χαρτί.

3. Βυθίζουμε το επίχρισμα για μικρό χρονικό διάστημα σε ξυλόλη και το στεγνώνουμε με απορροφητικό χαρτί.

Προσοχή! Η ξυλόλη είναι επιβλαβής γι' αυτό πρέπει να εργαζόμαστε σε απαγωγό εστία.

4. Περιλούζουμε το επίχρισμα με 0,5% (β/ο) υδατικό διάλυμα σαφρανίνης και το αφήνουμε για 10 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία εργαστηρίου.

Προσοχή! Η σαφρανίνη είναι επιβλαβής, γι' αυτό πρέπει να εργαζόμαστε σε απαγωγό εστία.

5. Ξεπλένουμε ήπια με ρέον νερό της βρύσης, στεγνώνουμε με απορροφητικό χαρτί και τοποθετούμε μία καλυπτρίδα.

6. Εξετάζουμε το χρωσμένο επίχρισμα σε φωτομικροσκόπιο με ελαιοκαταδυτικό φακό και με κλίμακα μεγέθυνσης 1000 x.

Τα κοκκία PHB στα κύτταρα του Ralstonia solanacearum εμφανίζονται χρωσμένα μπλε-μαύρα. Το κυτταρικό τοίχωμα εμφανίζεται με ροζ χρώση.

Άλλες δοκιμές

Άλλες κατάλληλες δοκιμές διαλογής είναι η δοκιμή IF (τμήμα III.2), η δοκιμή ELISA (τμήμα III.3) και η δοκιμή PCR (τμήμα III 4).

3. Διαδικασία απομόνωσης

3.1. Λαμβάνεται εξίδρωμα ή τμήματα μεταχρωματισμένου ιστού από τον αγγειώδη δακτύλιο του κονδύλου πατάτας ή τις αγγειώδεις δέσμες του στελέχους πατάτας ή τομάτας. Παρασκευάζεται αιώρημα των ανωτέρω σε μικρό όγκο αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού ή σε 50 mM φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος. Το αιώρημα αφήνεται για 5-10 λεπτά πάνω στον πάγκο.

3.2. Παρασκευάζονται σειρές δεκαπλών αραιώσεων του αιωρήματος π.χ. 1/10 και 1/100 ή περισσότερες αν θεωρηθεί απαραίτητο.

3.3. Συγκεκριμένη ποσότητα του αιωρήματος και των αραιώσεων μεταφέρεται σε γενικής χρήσης θρεπτικό υπόστρωμα (NA, YPGA και SPA, τμήμα III προσάρτημα 1) ή/και σε υπόστρωμα του Kelman με tetrazolium (τμήμα III προσάρτημα 1) ή/και σε εκλεκτικό υπόστρωμα SMSA (τμήμα III προσάρτημα 7) και απλώνεται ή εξαπλώνεται γραμμωτά με κατάλληλη τεχνική αραιώσεως επί του υποστρώματος. Αν θεωρηθεί χρήσιμο, προετοιμάζονται ξεχωριστά τρυβλία από κάθε υπόστρωμα με αραιωμένο αιώρημα καλλιέργειας παθογόνου στελέχους Ralstonia solanacearum βιοποικιλίας 2, φυλής 3 που χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας.

3.4. Τα τρυβλία επωάζονται 3 ημέρες στους 280 C. Η επώαση μπορεί να παραταθεί στις 6 ημέρες, αν η ανάπτυξη είναι αργή, αλλά οι αποικίες επί SMSA συχνά γίνονται μη τυπικές και νεκρώνονται.

Στα γενικής χρήσεως θρεπτικά υποστρώματα οι παθογόνες απομονώσεις Ralstonia solanacearum αναπτύσσουν μαργαριτώδους χροιάς λευκές, επίπεδες, ακανόνιστες και ρευστώδεις αποικίες που εμφανίζουν συχνά χαρακτηριστικές σπείρες.

Σε υπόστρωμα Kelman με tetrazolium, τυπικές αποικίες παθογόνων απομονώσεων του Ralstonia solanacearum είναι κρεμώδεις, επίπεδες, με ακανόνιστο περιθώριο και υδαρείς με αιματέρυθρες ελικώσεις στο κέντρο. Μη πα-

θογόνες απομονώσεις του Ralstonia solanacearum αναπτύσσουν βουτυρώδεις έντονα ερυθρές αποικίες.

Στο SMSA, τυπικές αποικίες παθογόνων απομονώσεων του Ralstonia solanacearum αναπτύσσουν γαλακτώδους χροιάς λευκές, επίπεδες, ακανόνιστες στο περιθώριο και ρευστώδεις αποικίες με αιματέρυθρα κέντρα.

Οι μη παθογόνες μορφές Ralstonia solanacearum αναπτύσσουν λιγότερο ρευστώδεις αποικίες, οι οποίες στο SMSA εμφανίζονται τελείως ροζ προς ερυθρές.

3.5. Οι αποικίες με χαρακτηριστική μορφολογία καθορίζονται με εκ νέου καλλιέργεια σε γενικής χρήσεως θρεπτικό υπόστρωμα. Πρέπει να αποφεύγονται επανειλημμένες εκ νέου καλλιέργειες γιατί αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της παθογένειας.

4. Δοκιμή (-ές) επιβεβαίωσης

4.1. Ταυτοποίηση του Ralstonia solanacearum

Η ταυτοποίηση καθαρών καλλιεργειών του Ralstonia solanacearum γίνεται με μία από τις ακόλουθες διαδικασίες:

Θρεπτικές και ενζυματικές δοκιμές

Σημείωση: Να περιλαμβάνονται κατάλληλα στελέχη ως μάρτυρες σε κάθε δοκιμή.

Το Ralstonia solanacearum παρουσιάζει ή όχι εν γένει τις ακόλουθες φαινοτυπικές ιδιότητες:

Φθορίζουσα χρωστική	-
Έγκλειστα PHB	+
Δοκιμή οξείδωσης/ζύμωσης (O/F)	O+/F-
Καταλάση	+
Οξειδάση Kovac's	+
Αναγωγή νιτρικών	+
Χρησιμοποίηση κιτρικών	+
Ανάπτυξη σε 40°C	-
Ανάπτυξη σε 1% NaCl	+
Ανάπτυξη σε 2% NaCl	-
Διυδρολάση αργινίνης	-
Ρευστοποίηση ζελατίνης	-
Υδρόλυση αμύλου	-
Υδρόλυση αισκουλίνης	-
Παραγωγή levan	-

Υλικά και μέθοδοι παρέχονται στην εργασία των Lelliott και Stead (1987).

Δοκιμή IF

Παρασκευάζουμε αιώρημα 10^6 κυττάρων ανά ml από την καλλιέργεια και ένα θετικό μάρτυρα. Παρασκευάζουμε επίσης μία σειρά αραιώσεων του αντιορού στο διπλάσιο. Εφαρμόζουμε τη διαδικασία IF (τμήμα III.2). Ο τίτλος IF της καλλιέργειας πρέπει να είναι ισοδύναμος με εκείνον του θετικού μάρτυρα.

Δοκιμή ELISA

Παρασκευάζουμε αιώρημα $>10^6$ κυττάρων ανά ml από την καλλιέργεια και ένα θετικό μάρτυρα. Εφαρμόζουμε τη διαδικασία ELISA (τμήμα III.3). Ο τίτλος ELISA της καλλιέργειας πρέπει να είναι ισοδύναμος με εκείνον του θετικού μάρτυρα.

Δοκιμή PCR

Παρασκευάζουμε αιώρημα 10^6 κυττάρων ανά ml από την καλλιέργεια και ένα θετικό μάρτυρα. Εφαρμόζουμε τη διαδικασία PCR - (τμήμα III.4) Το προϊόν PCR της καλλιέργειας πρέπει να έχει το ίδιο μέγεθος και μορφή REA με εκείνα του θετικού μάρτυρα.

Φθορίζων in situ υβριδισμός (FISH)

Παρασκευάζουμε αιώρημα 10^6 κυττάρων ml από την καλλιέργεια και ένα θετικό μάρτυρα. Εφαρμόζουμε τη διαδικασία FISH (van Beuningen et al., 1995) χρησιμοποιώντας τον εκκινητή (primer) PCR OLI-1 (Seal et al., 1993) Η καλλιέργεια πρέπει να εμφανίζει την ίδια αντίδραση με το θετικό μάρτυρα.

Προφίλ πρωτεϊνών

Οι μετουσιωμένες ολοκυτταρικές πρωτεΐνες διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου - PAGE (Stead, 1992a).

Προφίλ σε λιπαρά οξέα (FAP).

Αναπτύσσουμε την καλλιέργεια και ένα στέλεχος θετικού μάρτυρα για 48 ώρες στους 28°C σε trypticase soy agar και εφαρμόζουμε τη διαδικασία FAP (Jance,1991, Stead, 1992a, Stead, 1992b). Το προφίλ λιπαρών οξέων της καλλιέργειας πρέπει να είναι ίδιο με εκείνο του θετικού μάρτυρα. Στις καθορισμένες συνθήκες, τα χαρακτηριστικά λιπαρά οξέα είναι 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH και 18:1 2OH.

4.2. Χαρακτηρισμός στελέχους

Ο χαρακτηρισμός του στελέχους είναι προαιρετικό αλλά συστήνεται για κάθε νέα περίπτωση, χρησιμοποιώντας τουλάχιστον μία από τις ακόλουθες διαδικασίες:

Χαρακτηρισμός βιοποικιλίας

Το Ralstonia solanacearum διαχωρίζεται σε βιοποικιλίες βάσει της ικανότητάς του να παράγει οξύ από τρεις εξοζοαλκοόλες και τρία σάκχαρα (Hayward, 1964 και 1994).

	Βιοποικιλία				
	1	2	3	4	5
Χρήση					
- μαλτόζης	-	+	+	-	+
- λακτόζης	-	+	+	-	+
- κελλοβιόζης	-	+	+	-	+
- μαννιτόλης	-	-	+	+	+
- σορβιτόλης	-	-	+	+	-
- δουλκιτόλης	-	-	+	+	-

Με πρόσθετες δοκιμές, η βιοποικιλία 2 μπορεί να διαφοροποιηθεί σε υποφαινοτύπους (Hayward, 1994):

	Βιοποικιλία 2	**βιοποικιλία 2-A**	**Βιοποικιλία 2-T**
Χρήση τρεαλόζης	-	+	+
Χρήση ινοσιτόλης	+	-	+
Χρήση D-ριβόζης	-	-	+
Πηκτινολυτική δράση	μικρή	Μικρή	μεγάλη

Προσδιορισμός φυλής

Η φυλή (Buddenhagen et al., 1962) μπορεί να προσδιορισθεί με βάση μία δοκιμή παθογένειας σε φυτά τομάτας

ή μελιτζάνας και σε φυτά καπνού και με μία αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) σε φύλλα καπνού (Lozano και Sequeira, 1970):

	Φυλή (*)		
	1	2	3
Αντίδραση σε:			
φυτά τομάτας /μελιτζάνας	μαρασμός	μη αντίδραση	μαρασμός
φυτά καπνού	μαρασμός	μη αντίδραση	μη αντίδραση
φύλλα καπνού	νέκρωση (48 ώρες) και μαρασμός (7-8 ημ.)	HP (12-24 ώρες)	χλώρωση (2-8 ημέρες)

(*) Η φυλή 4 (παθογόνος στο ginger και μερικούς άλλους ξενιστές) και η φυλή 5 (παθογόνος στη μουριά μόνο) δεν περιλαμβάνονται.

Ο χαρακτηρισμός της φυλής με τις δοκιμές παθογένειας ή υπερευαισθησίας σε καπνό, δεν είναι ίσως πολύ αξιόπιστος και αντ' αυτών μπορεί να προκύψει από τη βιοποικιλία και το φυτό ξενιστή προέλευσης.

Το γενωμικό αποτύπωμα

Η μοριακή διαφοροποίηση των στελεχών στο σύμπλοκο Ralstonia solanacearum μπορεί να γίνει με:

Ανάλυση RFLP (Cook et al.,1989)

Επαναληπτική αλληλουχία PCR [REP-, ERIC- και BOX-PCR (Louws et al., 1995 Smith et al., 1995)]

4.3. Δοκιμή παθογένειας

Η δοκιμή αυτή αποσκοπεί στην επιβεβαίωση της διάγνωσης του Ralstonia solanacearum και την εκτίμηση της παθογένειας των καλλιεργειών που ταυτοποιούνται ως Ralstonia solanacearum.

Παρασκευάζουμε μόλυσμα με 10^6 κύτταρα ανά ml από την καλλιέργεια και ένα θετικό στέλεχος μάρτυρα. Μολύνουμε 5-10 φυτά τομάτας ή μελιτζάνας στο τρίτο κατά προτίμηση πραγματικό στάδιο φυλλοφορίας (τμήμα ΙΙΙ.6). Αφήνουμε για επώαση μέχρι 2 εβδομάδες σε θερμοκρασία 22-28° C και υψηλή σχετική υγρασία με καθημερινό πότισμα. Παρατηρούμε αν εμφανίζονται συμπτώματα μαρασμού ή/και επιναστία, χλώρωση ή νανισμός.

Απομονώνουμε από φυτά που παρουσιάζουν συμπτώματα, ως ακολούθως:

- αφαιρούμε ένα μέρος ιστού από το στέλεχος, 2 cm πάνω από το σημείο μόλυνσης,

- τεμαχίζουμε τους ιστούς και παρασκευάζουμε αιώρημα σε ένα μικρό όγκο αποστειρωμένου, αποσταγμένου νερού ή σε 50 mM φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος. Ακολούθως γίνεται εξάπλωση επί στερεού θρεπτικού υποστρώματος, επώαση και έλεγχος παρουσίας τυπικών αποικιών του Ralstonia solanacearum.

ΤΜΗΜΑ ΙΙΙ

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ RALSTONIA SOLANACEARUM ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΟΝΔΥΛΩΝ ΠΑΤΑΤΑΣ

Σημείωση: Το κανονικό μέγεθος δείγματος είναι 200 κόνδυλοι. Η δοκιμασία όμως μπορεί να εφαρμοστεί και για δείγματα μικρότερα των 200 κονδύλων.

1. Προετοιμασία του δείγματος για δοκιμή.

Σημείωση:Το εκχυλισμένο ίζημα πατάτας που λαμβάνεται με τη διαδικασία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ανίχνευση του Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus.

Εφόσον κριθεί σκόπιμο, μπορούν να γίνουν και οι εξής προκαταρκτικές εργασίες:

i) το δείγμα επωάζεται στους 25-30°C για διάστημα μέχρι 2 εβδομάδες για την ενθάρρυνση πολλαπλασιασμού τυχόν χαμηλών πληθυσμών Ralstonia solanacearum.

ii) οι κόνδυλοι πλένονται κάτω από ρέον νερό της βρύσης με κατάλληλα απολυμαντικά και απορρυπαντικά. Οι κόνδυλοι στεγνώνουν στον αέρα.

1.1. Με ένα καθαρό και απολυμασμένο νυστέρι ή ειδικό μαχαίρι λαχανικών αφαιρείται η επιδερμίδα γύρω από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου του κονδύλου έτσι ώστε να φανούν πρώτα οι αγγειώδεις ιστοί. Αποκόπτουμε με προσοχή ένα μικρό κώνο (διάμετρος 3-5 mm) αγγειώδους ιστού από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου κάθε κονδύλου. Προσοχή ώστε η αφαιρούμενη ποσότητα μη αγγειώδους ιστού από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου κάθε κονδύλου να είναι η ελάχιστη δυνατή. Συνέχιση της διαδικασίας για κάθε κόνδυλο του δείγματος.

Σημείωση:Στο στάδιο αυτό οι κόνδυλοι μπορούν να εξεταστούν μακροσκοπικά (τμήμα ΙΙ.1). Κάθε κόνδυλος με συμπτώματα ή έντονη σήψη αφήνεται παράμερα και εξετάζεται χωριστά (τμήμα ΙΙ).

1.2. Οι κώνοι ιστών συλλέγονται μέσα σε ένα κλειστό δοχείο. Κατά προτίμηση, οι κώνοι από τα σημεία πρόσφυσης του στολονίου πρέπει να υποβάλλονται σε κατεργασία αμέσως. Εάν αυτό δεν είναι δυνατόν, αποθηκεύονται για χρονικό διάστημα όχι μεγαλύτερο από 24 ώρες, ή στους 4°C για χρονικό διάστημα όχι μεγαλύτερο από 72 ώρες.

1.3 Οι κώνοι από τα σημεία πρόσφυσης του στολονίου υποβάλλονται σε κατεργασία με μία από τις ακόλουθες διαδικασίες:

i) Οι κώνοι μεταφέρονται σε κατάλληλο δοχείο.

Προστίθεται ικανή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος διαβροχής (προσάρτημα 2) ώστε να καλυφθούν οι κώνοι.

Οι κώνοι θρυμματίζονται σε ένα Waring-Blender (μίξερ) ή με Ultra Turrax μέχρι πλήρους ομοιογενοποιήσεως. Πρέπει να αποφεύγεται η υπερβολική ομοιογενοποίηση.

Αφήνουμε το προϊόν να διαβραχεί για 15-30 λεπτά.

ιι) Οι κώνοι μεταφέρονται σε κατάλληλο δοχείο.

Προστίθεται ικανή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος διαβροχής ώστε να καλυφθούν οι κώνοι.

Το δοχείο τοποθετείται σε περιστροφικό αναδευτήρα.

Το περιεχόμενο αφήνεται να επωαστεί σε 50-100 rpm για 4 ώρες στους 20-22°C ή για 16-24 ώρες στους 4°C.

iii) Οι κώνοι μεταφέρονται σε ένα ανθεκτικό σάκο διαβροχής μίας χρήσης (π.χ. σάκο Stomacher με διαστάσεις 105 mm x 150 mm, αποστειρωμένο με ακτινοβολία).

Οι κώνοι συνθλίβονται προσεκτικά με ένα κατάλληλο εργαλείο, π.χ. σφυρί, μέχρι πλήρους ομοιογενοποιήσεως.

Προστίθεται ικανή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος διαβροχής για την επικάλυψη των συνθλιμμένων κώνων και το υγρό διαβροχής αφήνεται να κατακαθίσει για 15-30 λεπτά της ώρας.

1.4. Τα βακτήρια εξάγονται από κατεργασμένους κώνους με μία από τις ακόλουθες διαδικασίες:

i) Το υγρό διαβροχής μεταγγίζεται απαλά μέσα σε σωλήνα φυγοκέντρησης αφήνοντας τυχόν υπολείμματα ιστού μέσα στο δοχείο ή τον σάκο. Εφόσον το μεταγγιζόμενο υγρό διαβροχής εμφανίζεται θολό φυγοκεντρείται με ταχύτητα όχι μεγαλύτερη από 180 xg για 10 λεπτά σε θερμοκρασία κάτω από τους 10° C.

Το μεταγγισθέν υγρό διαβροχής ή το υπερκείμενο υγρό από το πρώτο στάδιο φυγοκέντρησης φυγοκεντρείται με ταχύτητα 7000 xg για 15 λεπτά ή με ταχύτητα 10.000 xg για 10 λεπτά σε θερμοκρασία μικρότερη από τους 10°C.

Το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται προσέχοντας να μη διαταραχθεί το ίζημα.

ii) Το υγρό διαβροχής διηθείται μέσω φίλτρου με μέγεθος πόρων 40-100 μm. Η διήθηση ενισχύεται με αντλία κενού.

Το διήθημα συλλέγεται σε ένα σωλήνα φυγοκέντρησης.

Το φίλτρο πλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα διαβροχής.

Το διήθημα φυγοκεντρείται με ταχύτητα 7.000 xg για 15 λεπτά ή με ταχύτητα 10.000 xg για 10 λεπτά σε θερμοκρασία μικρότερη από τους 10^0C.

Το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται προσέχοντας να μη διαταραχθεί το ίζημα.

1.5. Το ίζημα αναδιαλύεται σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος του ιζήματος (προσάρτημα 2).

Το αιώρημα διαιρείται σε δύο ίσα μέρη και κάθε μέρος μεταφέρεται σε ένα μικροφιαλίδιο.

Το ένα μικροφιαλίδιο χρησιμοποιείται για τη δοκιμή. Το υπόλοιπο από το εκχύλισμα αυτό διατηρείται κατά τη διάρκεια της δοκιμής στους 4^0C.

Στο άλλο μικροφιαλίδιο προστίθεται αποστειρωμένη γλυκερίνη σε τελική συγκέντρωση 10-25% (V/V). Ανακατεύεται με στροβιλισμό (vortex). Αποθηκεύεται στους -18^0 C (για εβδομάδες) ή στους -70^0C (για μήνες).

2. Δοκιμή ανοσοφθορισμού (IF)

Χρησιμοποιείται αντιορός για Ralstonia solanacearum, κατά προτίμηση για φυλή 3, βιοποικιλία 2. Ο τίτλος προσδιορίζεται σε αιώρημα 106 κυττάρων ανά ml από το ομόλογο στέλεχος Ralstonia solanacearum με κατάλληλη αραίωση συμπλόκου ισοθειοκυανικής φθορεϊσίνης (FITC), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο πρωτογενής αντιορός πρέπει να έχει τίτλο IF τουλάχιστον 1:2.000.

Χρησιμοποιούνται πολυφατνιακές αντικειμενοφόροι πλάκες μικροσκοπίου με 10 κατά προτίμηση φατνία διαμέτρου τουλάχιστον 6 mm.

Σε κάθε αντικειμενοφόρο περιλαμβάνεται μάρτυρας συμπλόκου FITC. Αν τυχόν στο μάρτυρα FITC παρατηρηθούν θετικά κύτταρα η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται συμπεριλαμβάνοντας και το μάρτυρα PBS.

Παρασκευάζονται ξεχωριστά ως θετικοί μάρτυρες αντικειμενοφόροι με αιώρημα 10^6 κυττάρων ανά ml από στέλεχος Ralstonia solanacearum κατάλληλης φυλής/βιοποικιλίας (π.χ. φυλής 3, βιοποικιλίας 2). Σε κάθε σειρά δοκιμών χρησιμοποιείται μία αντικειμενοφόρος.

2.1. Οι προς δοκιμή αντικειμενοφόροι ετοιμάζονται με μία από τις ακόλουθες διαδικασίες:

i) Σε περίπτωση ιζημάτων με μικρή σχετικά ποσότητα αμύλου:

Σε μία σειρά φατνίων, φέρεται μετρημένος με σιφώνιο συγκεκριμένος όγκος (15μl είναι αρκετός για φατνία με διάμετρο 6 mm - ο όγκος κλιμακώνεται προς τα άνω για μεγαλύτερα φατνία) του αιωρήματος του ιζήματος. Η άλλη σειρά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείγμα εις διπλούν ή για ένα δεύτερο δείγμα όπως φαίνεται στην εικόνα 1.

ii) Σε περίπτωση άλλων ιζημάτων:

Παρασκευάζονται δεκαπλές αραιώσεις, δηλαδή 1/10, 1/100 και 1/1000 του αιωρήματος του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα ιζήματος. Σε μία σειρά φατνίων, φέρεται μετρημένος με σιφώνιο συγκεκριμένος όγκος (15 μl είναι αρκετός για φατνία με διάμετρο 6 mm - ο όγκος κλιμακώνεται προς τα άνω για μεγαλύτερα φατνία) του αιωρήματος του ιζήματος από κάθε αραίωση. Η άλλη σειρά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείγμα εις διπλούν ή για ένα δεύτερο δείγμα όπως φαίνεται στην εικόνα 2.

2.2. Το περιεχόμενο των φατνίων αφήνεται να ξηραθεί. Τα βακτηριακά κύτταρα στην αντικειμενοφόρο προσηλώνονται με θέρμανση, με φλόγα ή με 95% αιθανόλη.

2.3. Διαδικασία IF

i) Σύμφωνα με την ετοιμασία της αντικειμενοφόρου στο σημείο 2.1.i:

Παρασκευάζεται μία σειρά αραιώσεων του αντιορού στο διπλάσιο σε ρυθμιστικό διάλυμα για IF (προσάρτημα 3):

1/4 του τίτλου (T/4), ½ του τίτλου (T/2), ο τίτλος (T) και το διπλάσιο του τίτλου (2T).

ii) Σύμφωνα με την ετοιμασία της αντικειμενοφόρου στο σημείο 2.1.ii:

Παρασκευάζεται η αραίωση εργασίας (WD) του αντιορού σε ρυθμιστικό διάλυμα για IF. Αραίωση εργασίας είναι η αραίωση του αντιορού που εμφανίζει την καλύτερη εξειδίκευση και είναι συνήθως το μισό του τίτλου.

Εικόνα 1

Ετοιμασία της αντικειμενοφόρου δοκιμής σύμφωνα με τα σημεία 2.1.i. και 2.3.i.

Καθορισμένη αραίωση αιωρήματος ιζήματος
(T= τίτλος)

	FITC	T/4	T/2	T	2T	⇨ Αραιώσεις αντιορού
Δείγμα 1	•1	•2	•3	•4	•5	
Δείγμα 1 εις διπλούν ή δείγμα 2	•6	•7	•8	•9	•10	

Εικόνα 2

Ετοιμασία της αντικειμενοφόρου δοκιμής σύμφωνα με τα σημεία 2.1.ii. και 2.3.ii.

FITC Καθορισμένη αραίωση αντιορού

	Μη αραιωμένο	Μη αραιωμένο	1/10	1/100	1/1000	⇨ Δεκαδική αραίωση ιζήματος
Δείγμα 1	•1	•2	•3	•4	•5	
Δείγμα 1 εις διπλούν ή δείγμα 2	•6	•7	•8	•9	•10	

2.3.1. Οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται πάνω σε ένυγρο απορροφητικό χαρτί.

Τα φατνία δοκιμής καλύπτονται με την ή τις αραιώσεις του αντιορού. Στα φατνία FITC φέρεται PBS. Ο όγκος του χρησιμοποιούμενου στα φατνία αντιορού πρέπει να είναι ισοδύναμος με τον όγκο του χρησιμοποιούμενου εκχυλίσματος.

2.3.2. Οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται κάτω από ένα κάλυμμα και επωάζονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

2.3.3. Τα σταγονίδια του αντιορού απομακρύνονται με ένα ελαφρό τίναγμα από την αντικειμενοφόρο και οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται προσεκτικά με ρυθμιστικό διάλυμα IF. Πλύση επί 5 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα-Tween IG και ακολούθως επί 5 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα IF (προσάρτημα 3).

Η περίσσεια του υγρού απομακρύνεται προσεκτικά.

2.3.4. Οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται πάνω σε ένυγρο απορροφητικό χαρτί.

Τα φατνία δοκιμής και το φατνίο του FITC καλύπτονται με την αραίωση του συμπλόκου FITC που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του τίτλου. Ο όγκος του χρησιμοποιούμενου στα φατνία συμπλόκου πρέπει να είναι ίδιος με τον όγκο του χρησιμοποιούμενου αντιορού.

2.3.5. Οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται κάτω από ένα κάλυμμα και επωάζονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

2.3.6. Τα σταγονίδια του συμπλόκου τινάζονται μακριά από την αντικειμενοφόρο και οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται και πλένονται όπως προηγουμένως (2.3.3.). Η περίσσεια του νερού απομακρύνεται προσεκτικά.

2.3.7. Σε κάθε φατνίο φέρονται με σιφώνιο 5-10 μl φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος γλυκερίνης 0,1M (προσάρτημα 3) ή παρομοίου ρευστού και τα φατνία καλύπτονται με μία καλυπτρίδα.

2.4. Ανάγνωση της δοκιμής IF

Οι αντικειμενοφόροι δοκιμής εξετάζονται σε μικροσκόπιο επιφθορισμού με φίλτρα κατάλληλα για την διέγερση του FITC, με ελαιοκαταδυτικό φακό και με μεγέθυνση 50-1000. Τα φατνία εξετάζονται κατά μήκος δύο καθέτων διαμέτρων και κατά την περίμετρό τους. Πρώτα ελέγχεται η αντικειμενοφόρος του θετικού μάρτυρα. Τα κύτταρα πρέπει να είναι πλήρως χρωσμένα με λαμπρό φθορισμό.

Σημείωση: Σε περίπτωση αποτυχίας, η δοκιμή επαναλαμβάνεται.

Γίνεται ανάγνωση αντικειμενοφόρων δοκιμής.

Ελέγχεται κατ' αρχάς ότι δεν υπάρχουν φθορίζοντα κύτταρα στα φατνία των μαρτύρων FITC. Αν υπάρχουν φθορίζοντα κύτταρα στο φατνίο FITC αυτό δείχνει μη ειδική σύζευξη του συμπλόκου, αυτοφθορισμό ή επιμόλυνση.

Σημείωση: Στις περιπτώσεις αυτές, η δοκιμή επαναλαμβάνεται.

Εξετάζεται αν υπάρχουν φθορίζοντα κύτταρα με τη χαρακτηριστική μορφολογία του Ralstonia solanacearum στα φατνία δοκιμής. Η ένταση του φθορισμού πρέπει να είναι ίδια με εκείνη του θετικού μάρτυρα με ίδια αραίωση αντιορού. Κύτταρα με ατελή χρώση ή με ασθενή φθορισμό δεν πρέπει να λαμβάνονται υπόψη, εκτός κι αν υπάρχουν πολλά τέτοια κύτταρα (βλέπε ερμηνεία αποτελεσμάτων της δοκιμής IF).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής IF

i) Εφόσον σε ένα δείγμα δεν ανευρίσκονται λαμπρώς φθορίζοντα κύτταρα με χαρακτηριστική μορφολογία, η δοκιμή IF είναι αρνητική.

ii) Εφόσον σε ένα δείγμα βρίσκονται λαμπρώς φθορίζοντα κύτταρα με χαρακτηριστική μορφολογία, προσδιορίζεται ο μέσος αριθμός κυττάρων ανά πεδίο μικροσκοπίου και υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων (N) ανά ml του αναδιαλυμένου ιζήματος (προσάρτημα 4).

Ένας πληθυσμός 10^3 περίπου ανά ml αναδιαλυμένου ιζήματος, θεωρείται το όριο ανίχνευσης της δοκιμής IF:

- σε δείγματα με $N > 10^3$ κύτταρα ανά ml αναδιαλυμένου ιζήματος, η δοκιμή IF θεωρείται θετική,
- σε δείγματα με $N < 10^3$ κύτταρα ανά ml αναδιαλυμένου ιζήματος, η δοκιμή IF μπορεί να θεωρηθεί θετική.

iii) Αν παρατηρηθούν μεγάλοι αριθμοί ($N > 10^5$ κύτταρα ανά ml) κυττάρων με ατελή ή ασθενή φθορισμό, με τον τίτλο του αντιορού, πρέπει να πραγματοποιείται μία δεύτερη δοκιμή:

- είτε μία δοκιμή βασισμένη σε μία διαφορετική βιολογική αρχή,
- ή επανάληψη της δοκιμής IF, με ένα δεύτερο αντιορό ή με 10 φορές αραιωμένο ίζημα.

3. **Δοκιμή ELISA**

(βασίζεται στην εργασία των Robinson-Smith et al., 1995)

Χρησιμοποιείται αντιορός για Ralstonia solanacearum, κατά προτίμηση έναντι φυλής 3, βιοποικιλίας 2. Ο τίτλος προσδιορίζεται σε αιώρημα 10^6 κυττάρων ανά ml από το ομόλογο στέλεχος Ralstonia solanacearum.

Συνιστάται η χρήση μικρότιτλων πλακών NUNC Polysorp.

Περιλαμβάνεται ένας αρνητικός μάρτυρας εκχυλίσματος πατάτας και ένας μάρτυρας από ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα αλατιού (PBS).

Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται αιώρημα $> 10^6$ κυττάρων ανά ml από στέλεχος Ralstonia solanacearum κατάλληλης φυλής/βιοποικιλίας. Η δοκιμή γίνεται με ταυτόσημο τρόπο με εκείνη του ή των δειγμάτων αλλά διαχωρίζεται σαφώς από τα δείγματα στη πλάκα.

3.1. 100-200 μl του αιωρήματος του ιζήματος φέρονται με σιφώνιο σε ένα μικροφιαλίδιο και θερμαίνονται για 4 λεπτά στους 100°C. Κατόπιν το μικροφιαλίδιο τοποθετείται σε πάγο.

3.2. Προστίθεται ίσος όγκος ανθρακικού ρυθμιστικού διαλύματος επικάλυψης διπλής ιοντικής ισχύος (προσάρτημα 5) και το περιεχόμενο ανακατεύεται σε συσκευή vortex.

3.3. Σε δύο τουλάχιστον φατνία της μικρότιτλης πλάκας φέρονται από 100 μl του ανωτέρω διαλύματος και επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C ή όλη τη νύκτα στους 4°C.

3.4. Η πλάκα τινάζεται ελαφρά για να απομακρυνθούν τα εκχυλίσματα από τα φατνία. Τα φατνία πλένονται τρεις φορές με PBS-Tween (προσάρτημα 5), αφήνοντας το τελευταίο διάλυμα πλυσίματος στα φατνία για 5 λεπτά τουλάχιστον.

3.5. Παρασκευάζεται η κατάλληλη αραίωση αντιορού Ralstonia solanacearum σε ρυθμιστικό προστατευτικό διάλυμα (blocking buffer) (προσάρτημα 5). Στα φατνία φέρονται 100 μl αραίωσης αντιορού.

Επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C.

3.6. Η πλάκα τινάζεται ελαφρά για να απομακρυνθεί ο αντιορός από τα φατνία και τα φατνία πλένονται όπως και προηγουμένως (σημείο 3.4).

3.7. Παρασκευάζεται η κατάλληλη αραίωση συμπλόκου αλκαλικής φωσφατάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα δεσμεύσεως. Φέρονται στα φατνία 100 μl από αυτή και επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C.

3.8. Η πλάκα τινάζεται ελαφρά για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του συμπλόκου από τα φατνία και τα φατνία πλένονται όπως και προηγουμένως (σημείο 3.4 και 3.6).

3.9. Παρασκευάζεται διάλυμα υποστρώματος αλκαλικής φωσφατάσης (προσάρτημα 5). Φέρονται στα φατνία 100 μl από αυτό και ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά έως 1 ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία εργαστηρίου.

3.10. Διαβάζεται η απορρόφηση στα 409 nm.

Ερμηνεία της δοκιμής ELISA

Η δοκιμή ELISA είναι αρνητική εάν η οπτική πυκνότητα (O.D.) του δείγματος είναι < 2xO.D. του αρνητικού μάρτυρα.

Η δοκιμή ELISA είναι θετική εάν η οπτική πυκνότητα (O.D.) του δείγματος είναι > 2x O.D. του αρνητικού μάρτυρα.

4. **Δοκιμή PCR**

(βασίζεται στην εργασία των Seal et al., 1993).

Σημείωση: Κατά τη διάρκεια της παρασκευής του δείγματος καθώς και των υπόλοιπων εργασιών για τη δοκιμή PCR, πρέπει να χρησιμοποιούνται ογκομετρικά ακροστόμια (pipette tips) με φίλτρο.

Παρασκευάζεται αιώρημα 10^6 κυττάρων ανά ml από στέλεχος Ralstonia solanacearum φυλής 3, βιοποικιλίας 2 ως θετικός μάρτυρας. Η δοκιμή γίνεται με ταυτόσημο τρόπο με εκείνη του ή των δειγμάτων.

4.1. 100 μl του αιωρήματος του ιζήματος φέρονται με σιφώνιο σε ένα μικροφιαλίδιο.

Εναλλακτικά 90 μl του αιωρήματος μεταφέρονται σε μικροφιαλίδιο περιέχον 10 μl NaOH 0,5M. Το περιεχόμενο του φιαλιδίου ανακατεύεται αναποδογυρίζοντας επανειλημμένα πάνω κάτω το μικροφιαλίδιο.

4.2. Το φιαλίδιο θερμαίνεται για 4 λεπτά στους 100^0 C και κατόπιν απομακρύνεται αμέσως πάνω σε πάγο.

4.3. Παρασκευάζονται δύο τουλάχιστον δεκαδικές αραιώσεις π.χ. 1/10 και 1/100, ή περισσότερες αν θεωρηθεί απαραίτητο, σε αποστειρωμένο απεσταγμένο ή υπέρ καθαρό νερό (UPW).

4.4. Παρασκευάζεται το μείγμα αντίδρασης PCR (προσάρτημα 6) προσθέτοντας σε αποστειρωμένο φιαλίδιο τα παρακάτω συστατικά με την ακόλουθη σειρά:

Για όγκο αντίδρασης 50 μl

Συστατικό	Ποσότητα	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο απεσταγμένο ή UPW	30,8 μl-33,8 μl	-
10x ρυθμιστικό διάλυμα PCR	5,0 μl	1x
d-ATP	1,0 μl	0,2 mM
d-CTP	1,0 μl	0,2 mM
d-GTP	1,0 μl	0,2 mM
d-TTP	1,0 μl	0,2 mM
Εκκινητής OLI-1 (20 μM)	2,5 μl	1 μM
Εκκινητής Y-2 (20 μM)	2,5 μl	1 μM
Taq πολυμεράση (5U/μl)	0,2 μl	1,0 U
Συνολικός όγκος	45 μl - 48 μl	

Για περισσότερες αντιδράσεις

Υπολογίζεται η ποσότητα κάθε συστατικού για τον απαιτούμενο αριθμό αντιδράσεων.

Τα συστατικά αναμειγνύονται και 45 μl-48 μl του μείγματος μεταφέρονται σε αποστειρωμένα φιαλίδια PCR.

Τα φιαλίδια με το μείγμα αντίδρασης PCR διατηρούνται σε πάγο.

Για όγκο 25 ml

Η ποσότητα των συστατικών μειώνεται αναλογικά.

4.5. Σύνθεση PCR

4.5.1. Προαιρετικό! Τα φιαλίδια με το βρασμένο δείγμα και τον θετικό μάρτυρα υποβάλλονται σε παλμική φυγοκέντρηση.

Προστίθενται, με την καθοριζόμενη σειρά, 2-5 μl του ή των δειγμάτων, υδατικού μάρτυρα και θετικού μάρτυρα στα φιαλίδια με το μείγμα αντίδρασης PCR.Τα φιαλίδια τοποθετούνται στο θερμικό μπλοκ στη μονάδα θέρμανσης του θερμικού κυκλοποιητή DNA.

4.5.2. Ακολουθείται το εξής πρόγραμμα:

1 κύκλος από:

i) 2 λεπτά στους 96^0 C: μετουσίωση του αρχικού DNA

50 κύκλοι από:

ii) 20 δευτερόλεπτα στους 94^0 C: μετουσίωση

iii) 20 δευτερόλεπτα στους 68^0 C: προσκόλληση εκκινητών

iv) 30 δευτερόλεπτα στους 72^0 C: επέκταση αντιγράφου

1 κύκλος από:

v) 10 λεπτά στους 72^0C: περαιτέρω επέκταση

1 κύκλος συνιστάμενος σε:

vi) διατήρηση στους 4^0C

Σημείωση: Οι παράμετροι αυτές ισχύουν για θερμικό κυκλοποιητή DNA Perkin Elmer 9600. Άλλοι θερμικοί κυκλοποιητές μπορεί να απαιτούν επίστρωση ορυκτελαίου στα φιαλίδια PCR ή/και τροποποίηση της διάρκειας των σταδίων ii), iii) και iv) στο πρόγραμμα σύνθεσης.

4.5.3. Τα φιαλίδια απομακρύνονται από τον θερμικό κυκλοποιητή. Το προϊόν PCR αναλύεται. Εάν αυτό δεν γίνει αμέσως, τα φιαλίδια αποθηκεύονται στους 4^0 C για χρήση την ίδια μέρα ή στους -18^0 C για αργότερα.

4.6. Ανάλυση του προϊόντος PCR

Τα Τμήματα DNA PCR ανιχνεύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο

4.6.1 Παρασκευάζεται κατάλληλη πηκτή αγαρόζης βράζοντας ήπια ποσότητα αγαρόζης σε tris-οξικό ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (TAE).

4.6.2. Η τηγμένη αγαρόζη ψύχεται στους 50-60^0 C, χύνεται στο καλούπι της μονάδας ηλεκτροφόρησης και εισάγεται η χτένα. Η πηκτή αφήνεται να στερεοποιηθεί.

4.6.3. Απομακρύνεται η χτένα. Η πηκτή βυθίζεται σε TAE έτσι ώστε ίσα-ίσα να καλύπτεται (2-3 mm) από το ρυθμιστικό διάλυμα.

4.6.4. 3 μl ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης φέρονται πάνω σε παραφίλμ. Προστίθενται 12 μl του προϊόντος PCR από τα δείγματα, το θετικό μάρτυρα ή τον υδατικό μάρτυρα και αναμειγνύονται με ελαφρά αναρρόφηση στο ογκομετρικό ακροστόμιο πριν από την φόρτωση στην πηκτή. Οι αναφερόμενοι όγκοι μπορούν να τροποποιηθούν προκειμένου να προσαρμοστούν στη χωρητικότητα των φατνίων στην πηκτή αγαρόζης.

4.6.5. Η φόρτωση γίνεται με προσοχή στα φατνία της πηκτής. Σε ένα τουλάχιστον φατνίο φέρεται για λόγους αναφοράς κατάλληλος ιχνηθέτης DNA.

4.6.6. Συνδέονται τα καλώδια στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και την πηγή τροφοδοσίας. Εφαρμόζεται τάση 5-8 V/cm μέχρις όπου το μέτωπο του ιχνηλάτη δείκτη φθάσει στο 1 cm από το άκρο της πηκτής.

4.6.7. Διακόπτεται η τροφοδοσία ρεύματος. Τα καλώδια αποσυνδέονται από τη μονάδα ηλεκτροφόρησης, απομακρύνεται με προσοχή η πηκτή και εμβαπτίζεται σε βρωμιούχο αιθίδιο για 30-45 λεπτά.

Σημείωση:Όταν χρησιμοποιούμε βρωμιούχο αιθίδιο, πρέπει να φορούμε πάντοτε γάντια γιατί είναι ισχυρό μεταλλαξιογόνο.

4.6.8. Ακολουθεί αποχρωματισμός σε απεσταγμένο νερό για 10-15 λεπτά.

4.6.9. Το ή τα συντεθειμένα τμήματα DNA εμφανίζονται με υπεριώδη ακτινοβολία. Το προϊόν PCR του Ralstonia solanacearum με εκκινητές OLI-1 και Y-2 έχει μήκος 288 bp. Συγκρίνεται σε σχέση με τον ιχνηθέτη DNA και τον θετικό μάρτυρα.

Σημείωση: Ο υδατικός μάρτυρας πρέπει σε κάθε περί-

πτωση να είναι αρνητικός. Εάν είναι θετικός, η δοκιμή επαναλαμβάνεται.

4.6.10. Η πηκτή, εφόσον χρειάζεται για το αρχείο, φωτογραφίζεται.

4.6.11. Η αυθεντικότητα του συντεθειμένου τμήματος DNA επιβεβαιώνεται με ανάλυση με ένζυμο περιορισμού (REA).

4.7. Ανάλυση με περιοριστικό ένζυμο (REA).

4.7.1. 8,5 μl από το προϊόν PCR (σημείο 4.5.3.) μεταφέρονται σε νέο μικροφιαλίδιο. Προστίθεται 1 μl 10 x ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου και 0,5 μl ένζυμο περιορισμού AvaII.

4.7.2. Αναμειγνύονται με ήπια αναρρόφηση στο ακροστόμιο. Εάν στα τοιχώματα του φιαλιδίου παραμείνουν σταγόνες, φυγοκεντρείται σε παλμική μικροφυγόκεντρο. Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στους 37^{0}C.

4.7.3. Το Τμήμα DNA που υπέστη πέψη αναλύεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης όπως προηγουμένως (σημείο 4.6.).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής PCR

Η δοκιμή PCR είναι αρνητική εφόσον δεν ανιχνεύεται το χαρακτηριστικό τμήμα 288 bp και το τμήμα ανιχνεύεται στο θετικό μάρτυρα Ralstonia solanacearum.

Η δοκιμή PCR είναι θετική εάν το τμήμα 288 bp ανιχνεύεται και η ανάλυση REA του συντεθειμένου τμήματος είναι ίδια με εκείνη του θετικού μάρτυρα Ralstonia solanacearum.

5. Εκλεκτική απομόνωση επί στερεού υποστρώματος.

(βασίζεται στην εργασία των Elphinstone et al., 1996)

5.1. Η δοκιμή πραγματοποιείται με κατάλληλη τεχνική αραιώσεων επί στερεού υποστρώματος π.χ.:

i) Παρασκευάζονται δύο τουλάχιστον δεκαδικές αραιώσεις, συγκεκριμένα 1/10 και 1/100 ή περισσότερες αν θεωρηθεί χρήσιμο, του αιωρήματος του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα ιζήματος. Συγκεκριμένος όγκος (50-100 μl) του αιωρήματος και κάθε αραίωσης μετρημένος με σιφώνιο φέρεται σε τροποποιημένο εκλεκτικό υπόστρωμα SMSA (προσάρτημα 7) και απλώνεται με μία γυάλινη ράβδο σε όλη την επιφάνεια του υποστρώματος.

Εφόσον κρίνεται σκόπιμο, πραγματοποιείται γραμμική εξάπλωση αραίωσης, 10 μl αναδιαλυμένου ιζήματος περνώντας κάθε φορά τη βελόνα από φλόγα.

ii) Συγκεκριμένος όγκος (50-100μl) του αιωρήματος μετρημένος με σιφώνιο μεταφέρεται σε τροποποιημένο εκλεκτικό υπόστρωμα SMSA και απλώνεται με μία γυάλινη ράβδο σε όλη την επιφάνεια του υποστρώματος. Η ράβδος σύρεται γραμμωτά σε δύο ακόμη τροποποιημένα τρυβλία SMSA χωρίς να την περάσουμε από φλόγα.

5.2. Αιώρημα 10^6 κυττάρων ανά ml από παθογόνο στέλεχος Ralstonia solanacearum φυλής 3, βιοποικιλίας 2 που παίζει ρόλο θετικού μάρτυρα εξαπλούται, με την ίδια τεχνική, σε μία σειρά ξεχωριστών τρυβλίων τροποποιημένων SMSA.

5.3. Τα τρυβλία επωάζονται στους 28^0 C. Μετά 3 ημέρες ξεκινά η ανάγνωση των τρυβλίων. Εάν το αποτέλεσμα είναι αρνητικό, αφήνονται να επωαστούν ακόμη μέχρι 6 ημέρες. Οι παθογόνες απομονώσεις του Ralstonia solanacearum αναπτύσσουν γαλακτώδους χροιάς λευκές, επίπεδες, ακανόνιστες και ρευστώδεις αποικίες με διακριτά ερυθρά προς το πορφυρούν κέντρα που εμφανίζουν εσωτερικές ραβδώσεις ή ελικώσεις.

5.4. Οι αποικίες με χαρακτηριστική μορφολογία καθαρίζονται με εκ νέου καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα γενικής χρήσεως (προσάρτημα 1).

5.5. Οι καθαρές καλλιέργειες ταυτοποιούνται (τμήμα ΙΙ.4.1.) και οι καλλιέργειες του Ralstonia solanacearum επιβεβαιώνονται με μία δοκιμή παθογένειας (τμήμα ΙΙ.4.3).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής (εκλεκτικής απομόνωσης επί στερεού υποστρώματος)

Η δοκιμή είναι αρνητική εάν δεν απομονωθούν αποικίες βακτηρίων μετά 6 ημέρες ή εάν δεν απομονωθούν χαρακτηριστικές αποικίες Ralstonia solanacearum υπό την προϋπόθεση ότι δεν υπάρχουν υπόνοιες για παρεμπόδιση από αποικίες άλλων βακτηρίων και χαρακτηριστικές αποικίες του Ralstonia solanacearum απομονώνονται από τους θετικούς μάρτυρες.

Η δοκιμή είναι θετική εάν απομονωθούν χαρακτηριστικές αποικίες Ralstonia solanacearum.

6. Βιοδοκιμή

(βασίζεται στην εργασία του Janse, 1988)

6.1. Χρησιμοποιούνται 10 προς δοκιμή ευαίσθητα σπορόφυτα τομάτας ή μελιτζάνας ευρισκόμενα στο στάδιο του 3ου πραγματικού φύλλου για κάθε δείγμα. Τα φυτά δεν ποτίζονται για 24 ώρες πριν από τη μόλυνση.

6.2. 100 μl του αιωρήματος του ιζήματος κατανέμονται μεταξύ των πειραματοφύτων. Τα στελέχη μολύνονται μεταξύ των κοτυληδόνων και σε ένα ή περισσότερα άλλα σημεία.

6.3. 10 σπορόφυτα μολύνονται με την ίδια τεχνική με αιώρημα 10^6 κυττάρων ανά ml από παθογόνο στέλεχος του Ralstonia solanacearum φυλής 3, βιοποικιλίας 2 για να χρησιμεύσουν ως θετικός μάρτυρας και με ρυθμιστικό διάλυμα ιζήματος για να χρησιμεύσουν ως αρνητικός μάρτυρας. Τα φυτά θετικοί μάρτυρες, διαχωρίζονται από τα άλλα φυτά προς αποφυγή επιμολύνσεων.

6.4. Τα σπορόφυτα αφήνονται να αναπτυχθούν για 4 εβδομάδες σε θερμοκρασία 22-28^{0}C με καθημερινό πότισμα και υψηλή σχετική υγρασία. Παρατηρούμε αν θα παρουσιαστούν συμπτώματα μαρασμού, επιναστίας, χλώρωσης ή/και νανισμού.

6.5. Από τα προσβεβλημένα φυτά γίνεται απομόνωση (τμήμα ΙΙ). Ταυτοποιούνται οι καθαρές καλλιέργειες με χαρακτηριστική μορφολογία (τμήμα ΙΙ.4.1) και οι καλλιέργειες του Ralstonia solanacearum επιβεβαιώνονται με δοκιμή παθογένειας (τμήμα ΙΙ.4.3).

6.6. Αν θεωρηθεί χρήσιμο, ελέγχεται η απουσία μόλυνσης σε παρτίδες πειραματοφύτων που δεν παρουσιάζουν ένδειξη μόλυνσης. Από κάθε φυτό αφαιρείται τμήμα του στελέχους μήκους 1 cm από σημείο ευρισκόμενο σε απόσταση 2 cm πάνω από το σημείο μόλυνσης. Οι ιστοί ομοιογενοποιούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα διαβροχής. Εκτελείται δοκιμή απομόνωσης με την τεχνική των αραιώσεων σε στερεό υπόστρωμα (τμήμα ΙΙΙ.5.1). Εάν η δοκιμή αποδειχθεί θετική, οι καθαρές καλλιέργειες με χαρακτηριστική μορφολογία ταυτοποιούνται (τμήμα ΙΙ.4.1) και οι καλλιέργειες του Ralstonia solanacearum επιβεβαιώνονται με δοκιμή παθογένειας (τμήμα ΙΙ.4.3).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της βιοδοκιμής

Η βιοδοκιμή είναι αρνητική αν τα φυτά δοκιμής δεν είναι προσβεβλημένα από το Ralstonia solanacearum υπό τον όρο ότι το Ralstonia solanacearum ανιχνεύεται στους θετικούς μάρτυρες.

Η βιοδοκιμή είναι θετική αν τα φυτά δοκιμής είναι προσβεβλημένα από το Ralstonia solanacearum.

7. Δοκιμή εμπλουτισμού

(βασίζεται στην εργασία των Elphinstone et. al., 1996)

7.1. 100 μl του αιωρήματος του ιζήματος μεταφέρονται σε 3 ml τροποποιημένου ζωμού SMSA (προσάρτημα 7).

7.2. Επωάζονται για 48 ώρες, εν πάση δε περιπτώσει όχι περισσότερο από 72 ώρες, στους 28°C διατηρώντας το καπάκι του σωλήνα προσαρμοσμένο χαλαρά για να αερίζονται.

7.3. Το καπάκι σφίγγεται και ακολουθεί ανάδευση σε συσκευή vortex. Λαμβάνεται κατάλληλη ποσότητα για τη δοκιμή IF (τμήμα III.2), τη δοκιμή ELISA (τμήμα III.3) ή/και τη δοκιμή PCR (τμήμα III.4).

8. Δοκιμή παθογένειας

Αναφέρεται στο τμήμα II.4.3.

Προσάρτημα 1

Θρεπτικά υλικά για την απομόνωση και καλλιέργεια του Ralstonia solanacearum

Nutrient Agar (NA)

Nutrient Agar (Difco)	23 g
Αποσταγμένο νερό	1 λίτρο

Παρασκευάζονται ποσότητες ½ λίτρου από το θρεπτικό υλικό σε φιάλες 1 λίτρου.

Διαλύονται τα συστατικά.

Το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C επί 15 λεπτά.

Ακολουθεί ψύξη μέχρι τους 50°C και κατανέμεται σε τρυβλία.

Yeast-Peptone-Glucose-Agar (YPGA)

Yeast Extraict (Difco)	5g
Bacto Peptone (Difco)	5g
D (+) γλυκόζη (μονοϋδρική)	10g
Bacto Agar (Difco)	15g
Αποσταγμένο νερό	1 λίτρο

Παρασκευάζονται ποσότητες ½ λίτρου από το θρεπτικό υλικό σε φιάλες 1 λίτρου.

Διαλύονται τα συστατικά.

Το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C επί 15 λεπτά.

Ακολουθεί ψύξη μέχρι τους 50°C και κατανέμεται σε τρυβλία.

Sucrose Peptone Agar (SPA)

Σακχαρόζη	20g
Πεπτόνη	5g
K2HPO4	0,5g
MgSO47H2O	0,25g
Bacto Agar (Difco)	15g
Αποσταγμένο νερό	1 λίτρο

Παρασκευάζονται ποσότητες ½ λίτρου από το θρεπτικό υλικό σε φιάλες 1 λίτρου.

Διαλύονται τα συστατικά και ρυθμίζεται το pH σε μία τιμή από 7,2 έως 7,4 αν είναι απαραίτητο.

Το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C επί 15 λεπτά.

Ακολουθεί ψύξη μέχρι τους 50°C και κατανέμεται σε τρυβλία.

Θρεπτικό υλικό Kelman's tetrazolium

Casamino acids (Difco)	1g
Bacto Peptone (Difco)	10g
Δεξτρόζη	5g
Bacto Agar (Difco)	15g
Αποσταγμένο νερό	1 λίτρο

Παρασκευάζονται ποσότητες ½ λίτρου από το θρεπτικό υλικό σε φιάλες 1 λίτρου.

Διαλύονται τα συστατικά.

Το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C επί 15 λεπτά.

Ακολουθεί ψύξη μέχρι τους 50°C.

Προστίθεται υδατικό διάλυμα χλωριούχου τριφαινυλοτετραζολίου (Sigma), το οποίο έχει αποστειρωθεί με διήθηση από φίλτρο, ώστε να ληφθεί τελική συγκέντρωση 50 mg ανά λίτρο.

Το σύνολο κατανέμεται σε τρυβλία.

Προσάρτημα 2

Υλικά για την προετοιμασία του δείγματος δοκιμής

Ρυθμιστικό διάλυμα διαβροχής: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 50mM, pH 7,0.

Το εν λόγω ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για τη διαβροχή ιστών.

Na_2HPO_4	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Αποσταγμένο νερό	1 λίτρο

Διαλύονται τα συστατικά και ελέγχεται η τιμή του pH. Κατανέμονται κατάλληλες ποσότητες ανάλογα με τις ανάγκες.

Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C επί 15 λεπτά.

Κατά τη διεξαγωγή της δοκιμής PCR συνιστάται η προσθήκη διαλύματος poly vinyl pyrrolidone-40.000 (PVP-40) 5% προκειμένου να περιοριστεί η παρεμπόδιση της σύνθεσης DNA λόγω της παρουσίας αρωματικών μορίων στο εκχύλισμα.

Για τη διαβροχή των τεμαχίων των ιστών των γεωμήλων, συνιστάται η προσθήκη αντικροκιδωτικού, αντιαφριστικού παράγοντα ή αντιοξειδωτικού με την εφαρμογή της διαδικασίας ομογενοποίησης Waring Blender ή Ultra Turrax.

Lubrol flakes	0,5 g ανά λίτρο
DC silicone antifoam	1,0 ml ανά λίτρο
Πυροφωσφορικό τετρανάτριο	1,0 g ανά λίτρο

Το υλικό αυτό αποστειρώνεται ξεχωριστά σε αυτόκαυστο. Ακολουθεί προσθήκη (στο υλικό διαβροχής), έως ότου ληφθεί η επιθυμητή συγκέντρωση.

Ρυθμιστικό διάλυμα ιζήματος: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 10mM, pH 7,2.

Το εν λόγω ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για τον επανασχηματισμό αιωρήματος και την αραίωση των ιζημάτων των κώνων του σημείου πρόσφυσης του στολονίου των γεωμήλων.

$Na_2HPO_4X12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4X2H_2O$	0,4 g
Αποσταγμένο νερό	1 λίτρο

Διαλύονται τα συστατικά και ελέγχεται η τιμή του pH. Κατανέμονται κατάλληλες ποσότητες ανάλογα με τις ανάγκες.

Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C επί 15 λεπτά.

Προσάρτημα 3

Υλικά για τη δοκιμή IF

Ρυθμιστικό διάλυμα IF: φυσιολογικός ορός με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 10mM (PBS), pH 7,2.

Το εν λόγω ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για την

αραίωση των αντιορών.

$Na_2HPO_4X12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4X2H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Αποσταγμένο νερό	1 λίτρο

Διαλύονται τα συστατικά και ελέγχεται η τιμή του pH. Κατανέμονται κατάλληλες ποσότητες ανάλογα με τις ανάγκες.

Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C επί 15 λεπτά.

Ρυθμιστικό διάλυμα IF - Tween

Το εν λόγω ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για το πλύσιμο των πλακών. Προστίθεται 0,1% Tween 20 στο ρυθμιστικό διάλυμα IF.

0,1 M φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα γλυκερίνης, pH 7,6

Αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται ως ρευστό προσήλωσης στα φατνία της πλάκας της IF για την ενίσχυση του φθορισμού.

$Na_2HPO_4X12H_2O$	3,2 g
$NaH_2PO_4X2H_2O$	0,15 g
Γλυκερίνη	50 ml
Αποσταγμένο νερό	100 ml

Προσάρτημα 4

Προσδιορισμός του βαθμού μόλυνσης στη δοκιμή IF

Εμβαδόν (S) του φατνίου μιας πολυφατνιακής αντικειμενοφόρου:

$$S = \frac{\pi D^2}{4}$$

όπου D=διάμετρος του φατνίου (1)

Εμβαδόν (s) του οπτικού πεδίου του αντικειμενικού:

$$s = \frac{\pi d^2}{4}$$

όπου d= διάμετρος του οπτικού πεδίου. (2)

Το d υπολογίζεται είτε με απευθείας μέτρηση είτε με τους ακόλουθους τύπους:

$$s = \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 x4} \quad (3)$$

όπου i = συντελεστής πεδίου (εξαρτάται από τον τύπο προσοφθαλμίου και κυμαίνεται μεταξύ 8 και 24),

K=συντελεστής σωλήνα (1 ή 1,25),

G=μεγεθυντική ισχύς του αντικειμένου (100x, 40x κ.λ.π.)

από τον (2)

$$d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}} \quad (4)$$

από τον (3)

$$d = \sqrt{\frac{4x\frac{\pi i^2}{G^2K^2x4}}{\pi}} = \frac{i}{GK}$$

Μετράται ο αριθμός των τυπικών φθοριζόντων κυττάρων ανά πεδίο (c).

Υπολογίζεται ο αριθμός των τυπικών φθοριζόντων κυττάρων ανά φατνίο (C).

$$C = c\frac{S}{s}$$

Υπολογίζεται ο αριθμός τυπικών φθοριζόντων κυττάρων ανά ml ιζήματος (N)

$$N = Cx\frac{1000}{y}xF$$

όπου y=όγκος ιζήματος στο φατνίο

F=συντελεστής αραίωσης του ιζήματος.

Προσάρτημα 5

Υλικά για τη δοκιμή ELISA

Ανθρακικό ρυθμιστικό διάλυμα επικάλυψης, διπλής ισχύος, pH 9,6

Na_2CO_3	6,36 g
$NaHCO_3$	11,72 g
Αποσταγμένο νερό	1 λίτρο

Διαλύονται τα συστατικά και ελέγχεται η τιμή του pH. Κατανέμονται κατάλληλες ποσότητες ανάλογα με τις ανάγκες.

Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C επί 15 λεπτά.

Αν το εγχύλισμα περιέχει μεγόλο ποσοστό αρωματικών μορίων, μπορεί να προστεθεί, ως αντιοξειδωτικό, θειώδες νάτριο σε τελική συγκέντρωση 0,2%.

Φυσιολογικός ορός με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων10 x (PBS), pH 7,4

NaCl	80 g
KH_2PO_4	2 g
Na_2HPO_4 $X12H_2O$	29 g
KCl	2 g
Αποσταγμένο νερό	1 λίτρο

Διαλύονται τα συστατικά και ελέγχεται η τιμή του pH. Κατανέμονται κατάλληλες ποσότητες ανάλογα με τις ανάγκες.

Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C επί 15 λεπτά.

Φυσιολογικός ορός με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων - Tween (PBS-T)

10 x PBS	100 ml
10% Tween 20	5 ml
Αποσταγμένο νερό	895 ml

Ρυθμιστικό προστατευτικό διάλυμα (αντισωμάτων) (πρέπει να έχει παρασκευαστεί πρόσφατα)

10 x PBS	10ml
Polyvinylpyrrolidone-44000 MWT (PVP-44)	2 g
10% Tween 20	0,5 g
Γάλα σε σκόνη	0,5 g
Αποσταγμένο νερό έως	100 ml

Διάλυμα υποστρώματος αλκαλικής φωσφατάσης, pH 9,8

Διαιθανολαμίνη	97 ml
Αποσταγμένο νερό	800 ml

Αναμειγνύονται και ρυθμίζεται η τιμή του pH 9,8 με πυκνό HCl.

Συμπληρώνεται αποσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1 λίτρου.

Προστίθενται 0,2 g $MgCl_2$.

Διαλύονται 2 δισκία υποστρώματος φωσφατάσης των 5 mg (Sigma) ανά 15 ml διαλύματος.

Προσάρτημα 6

Υλικά για τη δοκιμή PCR

Ακολουθία ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών:

Εκκινητής OLI -1 5-GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3΄

Εκκινητής Y-2 5-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3΄

Για τα υλικά βλέπε την εργασία των Seal et. al. (1993).

Προσάρτημα 7

Υλικά για την εκλεκτική απομόνωση επί στερεού θρεπτικού υποστρώματος και δοκιμές εμπλουτισμού

Εκλεκτικό θρεπτικό υλικό SMSA (Engelbrecht 1994, όπως τροποποιήθηκε από τον Elphinstone et al., 1996)

Βασικό θρεπτικό υλικό

Casamino acids (Difco)	1 g
Bacto peptone (Difco)	10 g
Γλυκερίνη	5 ml
Άγαρ (Difco)	15 g
Αποσταγμένο νερό	1 λίτρο

Παρασκευάζονται ποσότητες ½ λίτρου από το θρεπτικό υλικό σε φιάλες 1 λίτρου.

Διαλύονται τα συστατικά και ελέγχεται η τιμή του pH. Πριν από την αποστείρωση σε αυτόκαυστο ρυθμίζεται το pH στην τιμή 6,5, αν κρίνεται απαραίτητο. Το Ralstonia solanacearum δεν αναπτύσσεται σωστά στο θρεπτικό υλικό, αν το pH είναι μεγαλύτερο του 7,0. Το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121^0C επί 15 λεπτά.

Ακολουθεί ψύξη μέχρι τους 50^0C.

Προστίθενται τα ακόλουθα συστατικά (όλα της Sigma) ώστε να ληφθούν οι προδιαγεγραμμένες τελικές συγκεντρώσεις.

Crystal violet 5 mg ανά λίτρο

Θειική πολυμιξίνη Β 100 mg ανά λίτρο (περίπου 600.000 μονάδες) Sigma P-1004

Βακιτρακίνη (*) 25 mg ανά λίτρο (περίπου 1250 μονάδες) Sigma P-0125

Χλωραμφενικόλη 5 mg ανά λίτρο Sigma C-3175

Πενικιλίνη - G 0,5 mg ανά λίτρο (περίπου 825 μονάδες) Sigma P-3032

Άλατα τετραζολίου 50 mg ανά λίτρο

Τα συστατικά διαλύονται σε αιθανόλη 70% μέχρι να ληφθούν οι τελικές συγκεντώσεις για τον όγκο του θρεπτικού υλικού που πρόκειται να παρασκευασθεί. Ορισμένα συστατικά, όπως η πολυμιξίνη Β και η χλωραμφενικόλη απαιτούν ελαφρά θέρμανση και ανάδευση.

Ζωμός SMSA (Elphinstone et. al., 1996)

Παρασκευάζεται όπως και το SMSA εκλεκτικό υλικό, αλλά παραλείπεται το άγαρ.

Κατανέμεται σε ποσότητες των 3ml σε σωλήνες Universal μιάς χρήσης των 30 ml.

(*) Αν χρειάζεται, είναι δυνατό, αυξάνοντας τη συγκέντρωση της βακιτρακίνης σε 300 ppm, να περιορισθεί η επιμόλυνση από σαπροφυτικά βακτηρίδια χωρίς να μειωθεί η ανάκτηση του Ralstonia solanacearum.

Βιβλιογραφία

Buddenhagen, I.W; Sequeira, L. and Kelman, A., 1962, Description of races in Pseudomonas solanacearum. Phytopathology 52, 726.

Cook, D; Elizabeth B. and Sequeira L., 1989. Genetic diversity of Pseudomonas solanacearum: detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and hypersensitive respons. Molecular Plant-Microbe Interactions 2, 113-121.

Dinesen I.G. and DeBoer, S.H., 1995. Extraction of Clavibacter-michiganensis subsp. sepedonicus from composite samples of potato tubers. American Potato Journal 72, 133-142.

Elphinstone, J.G.; Hennessy, J. ; Wilson. J. and Stead, D. E. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of Pseudomonas solanacearum (Smith) Smith in potato tuber extracts. EPPO Bulletin 26.

Engelbrecht, M.C., 1994. Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of Pseudomonas solanacearum. ACIAR Bacterial Wilt Newsletter 10, 3-5.

Hayward, A.C., 1964. Characteristics of Pseudomonas solanacearum.Journal of Applied Bacteriology 27, 265-277.

Hayward, A.C., 1994. Systematic and phylogeny of pseudomonas solanacearum and related bacteria. In: Bacterial Wilt:the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum (eds, A.C. Hayward and G.L. Hartman) CAB International Oxford, 127-135.

Janse, J.D., 1988. A detection method for Pseudomonas solanacearum in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. EPPO Bulletin 18, 343-351.

Janse, J.D., 1991. Infra-and intraspecific classification of Pseudomonas solanacearum strains using whole cell fatty acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14, 335-345.

Kelman, A., 1954. The relationship of pathogenicity in Pseudomonas solanacearum to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 64, 293-695.

Lelliot, R.A. and Stead, D.E., 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. (T.F. Preece ed.) Blackwell Scientific Publications, Oxford. 216 p.

Louws, F.J; Fulbright, D.W; Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify Xanthomonas campestris pv. vesicaroria. Phytopathology 85, 528-536.

Lozano, J.C. and Sequeira, L. 1970.Differentiation of races of Pseudomonas solanacearum by a leaf infiltration technique, Phytopathology 60, 838.

Mirza, M.S; Rademaker, J.W.L;, Janse, J.D. and Akkermans, A.D.L., 1993, Specific 16S ribosomal RNA targered oligonucleotide probe against Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus. Canadian journal of Microbiology 39, 1029-1034.

Robinson-Smith, A.; Jones, P.Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D., 1995. Production of antibodies to Pseudomonas solanacearum, the causative of bacterial wilt. Food and Agricultural Immunology 7, 67-79.

Seal, S.E.; Jackson, L.A.; Young, J.P.W. and Daniels, M.J., 1993. Differentiation of Pseudomonas solanacearum, P. syzygii, P.picketti and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. Journal of General Microbiology 139, 1587-1594.

Smith, J.J.; Offord, L.C.; Holderness, M. and Saddler, G.S., 1995. Genetic diversity of Burkholderia solanacearum (synonym Pseudomonas solanacearum) race 3 in Kenya. Applied and Environmental Microbiology 61, 4262-4268.

Stead, D.E., 1992a. Techniques for detecting and identifying plant pathogenic bacteria.In: Techniques for rapid detection of plant pathogens (eds. J.M. Duncan and L.Torrance). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 76-111.

Stead, D.E., 1992b. Grouping of plant pathogenic and some other Pseudomonas spp. using cellular fatty acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42, 281-295.

Van Beuningen, A.; Derks, H. and Janse J.D., 1995. Detection and identification of Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus with special attention to fluorescent in-situ hybridisation (FISH) using a 16S rRNA targeted oligonuckeotide probe. Zuchtugsforschung 2, 266-269.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

1. Για κάθε πιθανολογούμενη εμφάνιση για την οποία υπάρχει θετικό αποτέλεσμα από την ή τις μαζικές δοκιμές για μεν το καταχωρημένο φυτικό υλικό με τη μέθοδο του παραρτήματος ΙΙ, για δε όλες τις άλλες περιπτώσεις με οποιαδήποτε άλλη επισήμως εγκεκριμένη μέθοδο, και για την οποία αναμένεται επιβεβαίωση ή διάψευση με την εν λόγω μέθοδο, παρακρατούνται και φυλάσσονται καταλλήλως:

- στο μέτρο του δυνατού, η παρτίδα, ή μέρος της παρτίδας (από την οποία έχει ληφθεί το δείγμα) στην αρχική της συσκευασία με την ετικέτα,
- στο μέτρο του δυνατού, κάθε εναπομένον τμήμα των δειγμάτων,
- κάθε εναπομένον εκχύλισμα και υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την ή τις μαζικές δοκιμές π.χ. αντικειμενοφόροι ανοσοφθορισμού και
- όλη η σχετική τεκμηρίωση,

μέχρι την ολοκλήρωση της εν λόγω μεθόδου.

2. Σε περίπτωση επιβεβαίωσης της παρουσίας του οργανισμού, παρακρατείται και φυλάσσεται καταλλήλως:

- το υλικό που αναφέρεται στην παράγραφο 1 και
- ένα δείγμα του μολυσμένου υλικού τομάτας ή μελιτζάνας το οποίο έχει εμβολιαστεί με εκχύλισμα κονδύλου ή φυτού, κατά περίπτωση και
- η απομεμονωμένη καλλιέργεια του οργανισμού,

για τουλάχιστον ένα μήνα μετά τη διαδικασία γνωστοποίησης βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 2.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

Τα στοιχεία των ελέγχων που αναφέρονται στο άρθρο 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο i), περιλαμβάνουν κατά περίπτωση:

i) τους τόπους παραγωγής,

- όπου καλλιεργούνται ή έχουν καλλιεργηθεί πατάτες που έχουν κλωνική σχέση με τις μολυσμένες από τον οργανισμό πατάτες,
- όπου καλλιεργούνται ή έχουν καλλιεργηθεί τομάτες που έχουν την ίδια προέλευση με τις μολυσμένες από τον οργανισμό τομάτες,
- όπου καλλιεργούνται ή έχουν καλλιεργηθεί πατάτες ή τομάτες οι οποίες υπόκεινται σε επίσημο έλεγχο λόγω της πιθανολογούμενης εμφάνισης του οργανισμού,
- όπου καλλιεργούνται ή έχουν καλλιεργηθεί πατάτες που έχουν κλωνική σχέση με πατάτες που καλλιεργούνται σε μολυσμένους από τον οργανισμό τόπους,
- -όπου καλλιεργούνται πατάτες ή τομάτες που γειτνιάζουν με μολυσμένους τόπους παραγωγής, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που χρησιμοποιούν τον ίδιο εξοπλισμό και εγκαταστάσεις παραγωγής απευθείας ή μέσω κοινού αναδόχου,
- που χρησιμοποιούν επιφανειακό νερό για άρδευση ή ψεκασμό από πηγές για τις οποίες έχει επιβεβαιωθεί ή πιθανολογείται ότι έχουν μολυνθεί από τον οργανισμό,
- που χρησιμοποιούν επιφανειακό νερό για άρδευση ή ψεκασμό από πηγές που χρησιμοποιείται από κοινού με τόπους παραγωγής για τις οποίες έχει επιβεβαιωθεί ή πιθανολογείται ότι έχουν μολυνθεί από τον οργανισμό,
- που πλημμυρίζουν ή έχουν πλημμυρίσει με επιφανειακό νερό για το οποίο έχει επιβεβαιωθεί ή πιθανολογείται ότι έχει μολυνθεί από τον οργανισμό και

ii) το επιφανειακό νερό το οποίο χρησιμοποιήθηκε για άρδευση ή ψεκασμό στον ή τους αγρούς ή στον ή τους τόπους παραγωγής για τους οποίους έχει επιβεβαιωθεί ότι είναι μολυσμένοι από τον οργανισμό ή το οποίο πλημμύρισε τους εν λόγω αγρούς ή τόπους παραγωγής.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

1. Τα στοιχεία του προσδιορισμού της έκτασης της πιθανής μόλυνσης βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α, σημείο iii και του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο γ, σημείο iii, περιλαμβάνουν, κατά περίπτωση:

- το καταχωρημένο φυτικό υλικό που παράγεται σε τόπο παραγωγής χαρακτηρισμένο ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α, σημείο ii,
- τον ή τους τόπους παραγωγής που συνδέονται με το καταχωρημένο φυτικό υλικό που έχει χαρακτηρισθεί ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο

α, σημείο ii, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που χρησιμοποιούν τον ίδιο εξοπλισμό και εγκαταστάσεις παραγωγής απευθείας ή μέσω κοινού αναδόχου,

- το καταχωρημένο φυτικό υλικό που παράγεται στον ή τους τόπους παραγωγής που αναφέρονται στην προηγούμενη περίπτωση, ή που υπήρχε στον ή στους τόπους παραγωγής κατά την ίδια περίοδο κατά την οποία το καταχωρημένο φυτικό υλικό που χαρακτηρίστηκε ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α, σημείο ii, υπήρχε στους τόπους παραγωγής, που αναφέρονται στην πρώτη περίπτωση,

- τις αποθήκες που διακινούν το καταχωρημένο φυτικό υλικό προέλευσης των ανωτέρω τόπων παραγωγής,

- κάθε μηχάνημα, όχημα, περιέκτη, αποθήκη ή μονάδα αυτών και κάθε άλλο αντικείμενο, συμπεριλαμβανόμενων των υλικών συσκευασίας, που ενδέχεται να έχουν έλθει σε επαφή με το καταχωρημένο φυτικό υλικό χαρακτηρισμένο ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α, σημείο ii,

- κάθε καταχωρημένο φυτικό υλικό που έχει αποθηκευτεί ή ήλθε σε επαφή, με οποιαδήποτε κατασκευή ή αντικείμενο που απαριθμείται στην προηγούμενη περίπτωση πριν από τον καθορισμό και την απολύμανση αυτών των κατασκευών και αντικειμένων,

- βάσει των αποτελεσμάτων των ελέγχων και των δοκιμών που διενεργούνται σύμφωνα με το άρθρο 5 παράγραφος 1, στοιχείο α, σημείο i, για τις πατάτες, τους κονδύλους ή φυτά με αδελφική ή γονική κλωνική σχέση, και, για τις τομάτες, τα φυτά της ίδιας προέλευσης, με το καταχωρημένο φυτικό υλικό που χαρακτηρίστηκε ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α, σημείο ii, και τα οποία, μολονότι ενδέχεται να έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα κατά τις δοκιμές ανίχνευσης του οργανισμού, κρίνεται πιθανόν να είναι μολυσμένα λόγω κλωνικής σχέσης,

- τον ή τους τόπους παραγωγής του καταχωρημένου φυτικού υλικού που αναφέρεται στην προηγούμενη περίπτωση,

- τον ή τους τόπους παραγωγής του καταχωρημένου φυτικού υλικού που χρησιμοποιούν νερό για άρδευση ή ψεκασμό το οποίο έχει χαρακτηρισθεί ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α, σημείο ii,

- το καταχωρημένο φυτικό υλικό που έχει παραχθεί σε αγρούς οι οποίοι έχουν πλημμυρίσει με επιφανειακό νερό για το οποίο έχει επιβεβαιωθεί ότι έχει μολυνθεί από τον οργανισμό.

2. Ο προσδιορισμός της πιθανής μετάδοσης που αναφέρεται στο άρθρο 5 παράγραφος 1, στοιχείο α, σημείο iv και το άρθρο 5, παράγραφος 1, στοιχείο γ, σημείο iii, περιλαμβάνει:

i) στις περιπτώσεις βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α σημείο iv, τα ακόλουθα στοιχεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη:

- τη γειτνίαση άλλων τόπων παραγωγής όπου καλλιεργείται το καταχωρημένο φυτικό υλικό,

- τη συνήθη παραγωγή και χρησιμοποίηση του συγκεκριμένου αποθέματος πατατόσπορου,

- τους τόπους παραγωγής που χρησιμοποιούν επιφανειακό νερό για άρδευση ή ψεκασμό του καταχωρημένου φυτικού υλικού σε περιπτώσεις κατά τις οποίες υπάρχει ή υπήρξε κίνδυνος απορροών επιφανειακού νερού από καλλιεργήσιμα εδάφη που έχουν χαρακτηρισθεί ως μολυσμένα βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο ii), ή πλημμύρας των εδαφών αυτών από επιφανειακό νερό.

ii) στις περιπτώσεις κατά τις οποίες το επιφανειακό νερό χαρακτηρίστηκε ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο γ, σημείο ii:

- τον ή τους τόπους παραγωγής του καταχωρημένου φυτικού υλικού που γειτνιάζουν ή που υπάρχει κίνδυνος να πλημμυρίσουν με επιφανειακό νερό χαρακτηρισμένο ως μολυσμένο,

- οποιαδήποτε μη συρρέουσα αρδευτική λεκάνη που συνδέεται με το επιφανειακό νερό που έχει χαρακτηρισθεί ως μολυσμένο.

3. Οι λεπτομέρειες της γνωστοποίησης που αναφέρεται στο άρθρο 5 παράγραφος 2, πρώτο εδάφιο, περιλαμβάνουν:

- την ημερομηνία γνωστοποίησης της πιθανολογούμενης εμφάνισης βάσει του άρθρου 4 και τις ημερομηνίες των δειγματοληψιών και της επιβεβαίωσης της παρουσίας του οργανισμού βάσει του άρθρου 5, κατά περίπτωση,

- περιγραφή των στοιχείων της προσδιορισθείσας μόλυνσης και της οριοθέτησης της ζώνης.

4. Οι λεπτομέρειες της πρόσθετης γνωστοποίησης που αναφέρεται στο άρθρο 5 παράγραφος 2, δεύτερο εδάφιο, περιλαμβάνουν:

- για κάθε αποστολή ή παρτίδα πατάτας που έχει χαρακτηρισθεί ως μολυσμένη, κατά περίπτωση, τα πιστοποιητικά που ορίζονται στα άρθρα 7 και 8 του Π.Δ. 332/1995 (178Α), τον αριθμό διαβατηρίου ή τον αριθμό μητρώου του πατατοπαραγωγού, της συνεταιριστικής αποθήκης και του κέντρου αποστολής,

- για κάθε αποστολή ή παρτίδα τομάτας που έχει χαρακτηρισθεί ως μολυσμένη, τα πιστοποιητικά που ορίζονται στα άρθρα 7 ή 8 του Π.Δ. 332/1995 (178Α) και τον αριθμό διαβατηρίου, σύμφωνα με τον κατάλογο του παραρτήματος V, μέρος Α, τμήμα Ι σημείο 2.2 του Π.Δ. 332/1995 (178Α).

- την ονομασία και την κατηγορία της ποικιλίας για τα αποθέματα πατατόσπορου και, όπου είναι δυνατό, για όλες τις άλλες περιπτώσεις,

- οποιαδήποτε άλλη πληροφορία για το επιβεβαιωθέν κρούσμα την οποία απαιτεί η επιτροπή.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI

1. Όσον αφορά το άρθρο 6 παράγραφος 1, οι διατάξεις είναι οι εξής:

- καύση ή

- χρήση ως ζωοτροφή μετά από θερμική επεξεργασία ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος επιβίωσης του οργανισμού ή

- με εις βάθος ταφή σε τοποθεσία διάθεσης στην οποία δεν υπάρχει κίνδυνος διήθησης σε γεωργικά εδάφη ή επαφής με πηγές νερού που μπορούν να χρησιμοποιούνται για άρδευση γεωργικών εδαφών ή

- βιομηχανική μεταποίηση μέσω απευθείας και άμεση παράδοση σε μεταποιητική μονάδα με επισήμως εγκεκριμένες εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων οι οποίες ανταποκρίνονται στις διατάξεις του παραρτήματος VII της παρούσης οδηγίας ή

- άλλα μέτρα, με την προϋπόθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργα-

νισμού? τα μέτρα αυτά πρέπει να γνωστοποιούνται αμέσως στην επιτροπή. και τα άλλα κράτη μέλη.

2. Η κατάλληλη χρήση ή διάθεση του καταχωρημένου φυτικού υλικού που αναφέρεται στο άρθρο 6 παράγραφος 2, υπό τον έλεγχο της αρμόδιας αρχής, με την κατάλληλη συνεργασία μεταξύ των αρμόδιων επίσημων φορέων ώστε να εξασφαλίζεται πάντοτε ο έλεγχος αυτός και με την έγκρισή της όσον αφορά τις εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων όπου συσκευάζονται ή μεταποιούνται πατάτες είναι η ακόλουθη:

i) για τους κονδύλους πατάτας,

- χρήση ως πατάτες εμπορίου για κατανάλωση και συσκευασμένες σε χώρους με κατάλληλες εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων, έτοιμες για άμεση παράδοση και χρήση χωρίς νέα συσκευασία, και που προορίζονται για τέτοιου είδους άμεση παράδοση και χρήση ή

- χρήση ως πατάτες εμπορίου για βιομηχανική μεταποίηση, που προορίζονται για απευθείας και άμεση παράδοση σε μεταποιητική μονάδα με κατάλληλες εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων ή

- άλλη χρήση ή διάθεση, με την προϋπόθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού, και εφόσον έχει χορηγηθεί έγκριση. Τα μέτρα αυτά γνωστοποιούνται αμέσως στην επιτροπή. και τα λοιπά κράτη μέλη,

ii) για άλλα μέρη των φυτών, συμπεριλαμβανομένων των υπολειμμάτων βλαστών και φυλλώματος,

- καταστροφή ή

- άλλη χρήση ή διάθεση, με την προϋπόθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού? τα μέτρα αυτά πρέπει να γνωστοποιούνται στην επιτροπή και τα άλλα κράτη μέλη.

3. Οι κατάλληλες μέθοδοι απολύμανσης των αντικειμένων που αναφέρονται στο άρθρο 6 παράγραφος 3 πρέπει να είναι ο καθορισμός και, κατά περίπτωση, η απολύμανση, έτσι ώστε να μην υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού και πρέπει να εφαρμόζονται υπό την εποπτεία της αρμόδιας αρχής.

4. Η σειρά μέτρων που εφαρμόζονται στην ή τις ζώνες που οριοθετούνται βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α, σημείο iv και στοιχείο γ, σημείο iii, και αναφέρονται στο άρθρο 6 παράγραφος 4, περιλαμβάνει:

4.1. Σε τόπους παραγωγής που χαρακτηρίζονται ως μολυσμένοι βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α, σημείο ii:

α) σε αγρό ή μονάδα με προστατευμένες καλλιέργειες που χαρακτηρίζονται ως μολυσμένες βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α, σημείο ii, είτε

i) κατά τη διάρκεια τουλάχιστον τεσσάρων καλλιεργητικών ετών μετά το έτος της προσδιορισθείσας μόλυνσης,

- λαμβάνονται μέτρα για την εξάλειψη των αυτοφυών φυτών πατάτας και τομάτας και άλλων ξενιστών του οργανισμού συμπεριλαμβανόμενων των ζιζανίων της οικογένειας των σολανωδών και

- δεν φυτεύονται:

- κόνδυλοι ή φυτά πατάτας,

- φυτά και σπόροι τομάτας,

- ανάλογα με τη βιολογία του οργανισμού,

- άλλοι ξενιστές,

- φυτά του είδους Brassica, στα οποία υπάρχει εμφανής κίνδυνος επιβίωσης του οργανισμού,

- καλλιέργειες στις οποίες υπάρχει εμφανής κίνδυνος εξάπλωσης του οργανισμού,

- κατά την πρώτη καλλιεργητική περίοδο πατάτας ή τομάτας μετά την περίοδο που καθορίζεται στην προηγούμενη περίπτωση, και υπό την προϋπόθεση ότι ο αγρός είναι απαλλαγμένος από αυτοφυή φυτά τομάτας και πατάτας και άλλα φυτά ξενιστές συμπεριλαμβανομένων των ζιζανίων της οικογένειας των σολανωδών, πρέπει για δύο τουλάχιστον συναπτά καλλιεργητικά έτη πριν τη φύτευση,

- στην περίπτωση της πατάτας, να φυτεύεται επισήμως πιστοποιημένος πατατόσπορος μόνο για παραγωγή πατάτας εμπορίου και,

- να διεξάγεται επίσημη έρευνα συμπεριλαμβανομένων των δοκιμών, όπως προβλέπεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1,

- κατά την καλλιεργητική περίοδο πατάτας ή τομάτας μετά την περίοδο που καθορίζεται στην προηγούμενη περίπτωση και σύμφωνα με ένα κατάλληλο σύστημα αμειψισποράς, φυτεύεται, στην περίπτωση της πατάτας, επισήμως πιστοποιημένος πατατόσπορος για παραγωγή είτε πατατόσπορου είτε πατάτας εμπορίου και, στην περίπτωση της πατάτας και τομάτας, πραγματοποιείται επίσημος έλεγχος όπως καθορίζεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1 ή

ii) κατά τα πέντε καλλιεργητικά έτη μετά την περίοδο της προσδιορισθείσας μόλυνσης,

- λαμβάνονται μέτρα για την εξάλειψη των αυτοφυών φυτών πατάτας και τομάτας και άλλων ξενιστών του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων των ζιζανίων της οικογένειας των σολανωδών και

- ο αγρός διατηρείται, κατά τα πρώτα τρία έτη, είτε χέρσος είτε με σιτηρά ανάλογα με τον προσδιορισθέντα κίνδυνο, είτε ως μόνιμος βοσκότοπος στον οποίο η βλάστηση κόβεται συχνά και χαμηλά ή ο οποίος χρησιμοποιείται για εντατική βόσκηση ή ως χορτονομή για παραγωγή σπόρων? η φύτευση κατά τα ακόλουθα δύο έτη πραγματοποιείται με φυτά που δεν είναι ξενιστές του οργανισμού για τα οποία δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος επιβίωσης ή διάδοσης του οργανισμού,

- κατά την πρώτη καλλιεργητική περίοδο πατάτας ή τομάτας μετά την περίοδο που καθορίζεται στην προηγούμενη περίπτωση,

- στην περίπτωση της πατάτας, φυτεύεται επισήμως πιστοποιημένος πατατόσπορος για παραγωγή είτε πατατόσπορου είτε πατάτας εμπορίου,

και διεξάγεται επίσημη μελέτη, συμπεριλαμβανομένων δοκιμών, όπως καθορίζεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1.

β) σε άλλους αγρούς:

- κατά το καλλιεργητικό έτος μετά την προσδιορισθείσα μόλυνση:

- είτε δεν φυτεύονται κόνδυλοι ή φυτά πατάτας, ή άλλα φυτά ξενιστές του οργανισμού, και λαμβάνονται μέτρα για την εξάλειψη των αυτοφυών φυτών πατάτας και τομάτας και άλλων ξενιστών, συμπεριλαμβανομένων των ζιζανίων της οικογένειας των σολανωδών ή

- στην περίπτωση των κονδύλων πατάτας, φυτεύεται επισήμως πιστοποιημένος πατατόσπορος για παραγωγή πατάτας εμπορίου μόνο, υπό την προϋπόθεση ότι η αρμόδια αρχή κρίνει ότι έχει εξαλειφθεί ο κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού από αυτοφυή φυτά πατάτας και τομάτας ή άλλους ξενιστές του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων των ζιζανίων της οικογένειας των σολανωδών. Τα καλλιεργούμενα φυτά επιθεωρούνται την κατάλληλη στιγμή, τα δε τυχόν αυτοφυή φυτά πατάτας υποβάλλο-

νται σε δοκιμή για την ανίχνευση του οργανισμού? επιπλέον, για τις πατάτες πρέπει να ελέγχονται οι συγκομιζόμενοι κόνδυλοι,

- κατά το πρώτο καλλιεργητικό έτος μετά το καθοριζόμενο στην προηγούμενη περίπτωση,

- στην περίπτωση της πατάτας, φυτεύεται μόνον επισήμως πιστοποιημένος πατατόσπορος για παραγωγή είτε πατατόσπορου είτε πατάτας εμπορίου,

- τουλάχιστον για το δεύτερο καλλιεργητικό έτος μετά το καθοριζόμενο στην πρώτη περίπτωση,

- στην περίπτωση της πατάτας, φυτεύεται μόνον επισήμως πιστοποιημένος πατατόσπορος ή πατατόσπορος που έχει παραχθεί υπό επίσημο έλεγχο με επισήμως πιστοποιημένο πατατόσπορο για παραγωγή είτε πατατόσπορου είτε πατάτας εμπορίου,

- για κάθε καλλιεργητικό έτος που αναφέρεται στις προηγούμενες περιπτώσεις, λαμβάνονται μέτρα για την εξάλειψη των αυτοφυών φυτών πατάτας και τομάτας και άλλων ξενιστών του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων των ζιζανίων της οικογένειας των σολανωδών, και πραγματοποιείται επίσημη μελέτη όπως καθορίζεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1, και διεξάγεται έλεγχος των κονδύλων στις περιπτώσεις κατά τις οποίες ο πατατόσπορος φυτεύεται για την παραγωγή πατατόσπορου·

γ) αμέσως μετά το χαρακτηρισμό μολυσμένων αντικειμένων σύμφωνα με το άρθρο 5 παράγραφος 1, στοιχείο α), σημείο ii, και για κάθε επόμενο καλλιεργητικό έτος, μέχρι και την πρώτη επιτρεπόμενη καλλιεργητική περίοδο πατάτας ή τομάτας στον ή τους αγρούς που έχουν χαρακτηρισθεί μολυσμένοι, όπως περιγράφεται στο στοιχείο α):

- καθαρίζονται και, κατά περίπτωση, απολυμαίνονται κατάλληλα όλα τα μηχανήματα και οι αποθηκευτικοί χώροι του τόπου παραγωγής που έχουν σχέση με την παραγωγή πατάτας και τομάτας, με τις κατάλληλες μεθόδους, όπως ορίζεται στο σημείο 3,

- εφαρμόζονται κατάλληλοι επίσημοι έλεγχοι των προγραμμάτων άρδευσης και ψεκασμού, συμπεριλαμβανομένης της απαγόρευσης αυτών, προκειμένου να αποφευχθεί η διάδοση του οργανισμού·

δ) στις μονάδες προστατευόμενης παραγωγής που έχουν χαρακτηρισθεί ως μολυσμένες, βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α, σημείο ii, όπου είναι δυνατή η πλήρης αντικατάσταση του υποστρώματος βλάστησης,

- δεν φυτεύονται κόνδυλοι ή φυτά, ή ξενιστές του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων των φυτών και σπόρων τομάτας, παρά μόνο εάν στη μονάδα παραγωγής εφαρμόζονται επισήμως εποπτευόμενα μέτρα για την εξάλειψη του οργανισμού και την απομάκρυνση όλων των ξενιστών, συμπεριλαμβανομένων, τουλάχιστον, της πλήρους αντικατάστασης του υποστρώματος βλάστησης και του καθορισμού και, κατά περίπτωση, της απολύμανσης της μονάδας παραγωγής και όλου του εξοπλισμού, και, στη συνέχεια έχει χορηγηθεί άδεια για παραγωγή πατάτας ή τομάτας από τους αρμόδιους επίσημους φορείς και

- η παραγωγή πατάτας γίνεται από επισήμως πιστοποιημένο πατατόσπορο ή από μικροκονδύλους ή μικροφυτά που προέρχονται από ελεγμένες πηγές,

- εφαρμόζονται κατάλληλοι επίσημοι έλεγχοι των προγραμμάτων άρδευσης και ψεκασμού, συμπεριλαμβανομένης της απαγόρευσης αυτών, προκειμένου να αποφευχθεί η διάδοση του οργανισμού.

4.2. Εντός της οριοθετημένης ζώνης, με την επιφύλαξη των μέτρων που περιγράφονται στο σημείο 4.1., η αρμόδια αρχή:

α) αμέσως, και για τρία τουλάχιστον καλλιεργητικά έτη μετά την προσδιορισθείσα μόλυνση:

αα) στις περιπτώσεις κατά τις οποίες η οριοθετημένη ζώνη έχει χαρακτηρισθεί βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο α, σημείο iv,

- εξασφαλίζει, την εποπτεία των χώρων όπου καλλιεργούνται, αποθηκεύονται ή διακινούνται κόνδυλοι πατάτας ή τομάτες, καθώς και των χώρων στους οποίους λειτουργούν, βάσει σύμβασης, μηχανήματα για την παραγωγή πατάτας ή τομάτας,

- απαιτεί, κατά περίπτωση, καθαρισμό και απολύμανση των μηχανημάτων και των αποθηκών των χώρων αυτών με τις κατάλληλες μεθόδους, όπως ορίζεται στο σημείο 3,

- απαιτεί τη φύτευση αποκλειστικά πιστοποιημένου σπόρου ή σπόρου που έχει παραχθεί υπό επίσημο έλεγχο για όλες τις καλλιέργειες πατάτας της ζώνης αυτής, και δοκιμή, μετά τη συγκομιδή, του πατατόσπορου που παράγεται σε τόπους παραγωγής που έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανώς μολυσμένοι, σύμφωνα με το άρθρο 5 παράγραφος 1, στοιχείο α, σημείο iii,

- απαιτεί τη χωριστή διακίνηση των αποθεμάτων συγκομισθέντος πατατόσπορου και πατάτας εμπορίου για όλες τις εγκαταστάσεις της ζώνης,

- διενεργεί επίσημη μελέτη, όπως περιγράφεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1,

αβ) στις περιπτώσεις κατά τις οποίες το επιφανειακό νερό έχει χαρακτηρισθεί ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1, στοιχείο γ, σημείο ii, ή περιλαμβάνεται στα στοιχεία για πιθανή διάδοση του οργανισμού, σύμφωνα με το παράρτημα V, σημείο 2,

- διενεργεί ετήσια μελέτη την κατάλληλη στιγμή, συμπεριλαμβανομένης της δειγματοληψίας του επιφανειακού νερού και των κατάλληλων ξενιστών της οικογένειας των σολανωδών στις σχετικές πηγές επιφανειακού νερού και διεξάγει δοκιμές

- για το καταχωρημένο φυτικό υλικό, με τη σχετική μέθοδο του παραρτήματος II ή

- στις λοιπές περιπτώσεις, με άλλη επίσημα εγκεκριμένη μέθοδο,

- εφαρμόζει επίσημους ελέγχους των προγραμμάτων άρδευσης και ψεκασμού, συμπεριλαμβανομένης της απαγόρευσης χρήσης του νερού που έχει χαρακτηρισθεί ως μολυσμένο για την άρδευση και το ψεκασμό του καταχωρημένου φυτικού υλικού, και, κατά περίπτωση, άλλων ξενιστών προκειμένου να αποφευχθεί η διάδοση του οργανισμού. Η απαγόρευση αυτή επανεξετάζεται βάσει των αποτελεσμάτων της προαναφερόμενης ετήσιας έρευνας,

- στις περιπτώσεις κατά τις οποίες οι απορρίψεις υγρών αποβλήτων είναι μολυσμένες, εφαρμόζει επίσημους ελέγχους για τη διάθεση των αποβλήτων από χώρους βιομηχανικής μεταποίησης ή συσκευασίας του καταχωρημένου φυσικού υλικού.

β) καταρτίζει, κατά περίπτωση, προγράμματα αντικατάστασης όλων των αποθεμάτων πατατοσπόρου σε εύθετο χρονικό διάστημα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII

Οι επισήμως εγκεκριμένες εγκαταστάσεις διάθεσης α-

ποβλήτων που αναφέρονται στο παράρτημα VI, παράγραφος 1, τέταρτο εδάφιο, συμμορφώνονται με τις ακόλουθες διατάξεις προκειμένου να αποφευχθεί ο κίνδυνος διάδοσης του οργανισμού:

i) απόβλητα από την επεξεργασία πατάτας και τομάτας (συμπεριλαμβανόμενων των απορρίψεων πατατών, φλοιού πατάτας και τοματών) και οποιοδήποτε άλλο στερεό απόβλητο που προέρχεται από πατάτες και τομάτες πρέπει να απομακρύνεται, είτε

- με εις βάθος ταφή σε τοποθεσία διάθεσης, στην οποία δεν υπάρχει κίνδυνος διήθησης σε γεωργικά εδάφη ή επαφής με πηγές νερού που μπορούν να χρησιμοποιούνται για άρδευση γεωργικών εδαφών. Τα απόβλητα μεταφέρονται απευθείας στην τοποθεσία υπό συνθήκες περιορισμού, ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος απώλειας των αποβλήτων ή

- με καύση,

ii) υγρά απόβλητα επεξεργασίας: πριν από τη διάθεσή τους, τα υγρά απόβλητα που περιλαμβάνουν αιωρούμενα στερεά στοιχεία υποβάλλονται σε διαδικασίες διήθησης ή καθίζησης για την απομάκρυνση αυτών των στερεών στοιχείων. Η διάθεση των στερεών αυτών στοιχείων γίνεται με τους τρόπους που προβλέπονται στο σημείο i.

Τα υγρά απόβλητα πρέπει είτε:

- να θερμαίνονται τουλάχιστον σε 700C επί τουλάχιστον 30 λεπτά πριν από τη διάθεσή τους ή

- να διατίθενται με άλλο τρόπο που έχει εγκριθεί επισήμως και υπό επίσημο έλεγχο, ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος επαφής των αποβλήτων με γεωργικά εδάφη ή πηγές νερού που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για άρδευση γεωργικών εδαφών. Οι λεπτομέρειες αυτές πρέπει να κοινοποιούνται στα άλλα κράτη μέλη και την Επιτροπή.

Άρθρο 12

(Άρθρο 12 Οδηγίας 98/57/ΕΚ)

Το παρόν διάταγμα ισχύει από τις 21 Αυγούστου 1999.

Στον Υφυπουργό Γεωργίας αναθέτουμε τη δημοσίευση και εκτέλεση του παρόντος διατάγματος.

Αθήνα, 22 Σεπτεμβρίου 2000

Ο ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΤΕΦΑΝΟΠΟΥΛΟΣ

ΟΙ ΥΠΟΥΡΓΟΙ

ΕΘΝΙΚΗΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΩΝ
Γ. ΠΑΠΑΝΤΩΝΙΟΥ

ΥΦΥΠΟΥΡΓΟΣ ΓΕΩΡΓΙΑΣ
Ε. ΑΡΓΥΡΗΣ

ΕΘΝΙΚΟ ΤΥΠΟΓΡΑΦΕΙΟ

ΕΦΗΜΕΡΙΔΑ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ

ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΟΥ 34 * ΑΘΗΝΑ 104 32 * TELEX 223211 YPET GR * FAX 52 34 312
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ: http: www.et.gr
e-mail: webmaster @ et.gr

ΥΠΗΡΕΣΙΕΣ ΕΞΥΠΗΡΕΤΗΣΗΣ ΠΟΛΙΤΩΝ

ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ
Σολωμού 51

Πληροφορίες δημοσιευμάτων Α.Ε. - Ε.Π.Ε.	**5225 761 - 5230 841**
Πληροφορίες δημοσιευμάτων λοιπών Φ.Ε.Κ.	**5225 713 - 5249 547**
Πώληση Φ.Ε.Κ.	**5239 762**
Φωτοαντίγραφα παλαιών Φ.Ε.Κ.	**5248 141**
Βιβλιοθήκη παλαιών Φ.Ε.Κ.	**5248 188**
Οδηγίες για δημοσιεύματα Α.Ε. - Ε.Π.Ε.	**5248 785**
Εγγραφή Συνδρομητών Φ.Ε.Κ. και αποστολή Φ.Ε.Κ.	**5248 320**

ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΑ ΓΡΑΦΕΙΑ
ΠΩΛΗΣΗΣ Φ.Ε.Κ.

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ - Βασ. Όλγας 227 - Τ.Κ. 54100	**(031) 423 956**
ΠΕΙΡΑΙΑΣ - Νικήτα 6-8 Τ.Κ. 185 31	**4135 228**
ΠΑΤΡΑ - Κορίνθου 327 - Τ.Κ. 262 23	**(061) 6381 100**
ΙΩΑΝΝΙΝΑ - Διοικητήριο Τ.Κ. 450 44	**(0651) 87215**
ΚΟΜΟΤΗΝΗ - Δημοκρατίας 1 Τ.Κ. 691 00	**(0531) 22 858**
ΛΑΡΙΣΑ - Διοικητήριο Τ.Κ. 411 10	**(041) 597449**
ΚΕΡΚΥΡΑ - Σαμαρά 13 Τ.Κ. 491 00	**(0661) 89 127 / 89 120**
ΗΡΑΚΛΕΙΟ - Πλ. Ελευθερίας 1, Τ.Κ. 711 10	**(081) 396 223**
ΛΕΣΒΟΣ - Πλ. Κωνσταντινουπόλεως Τ.Κ. 811 00 Μυτιλήνη	**(0251) 46 888 / 47 533**

ΤΙΜΗ ΠΩΛΗΣΗΣ ΦΥΛΛΩΝ ΕΦΗΜΕΡΙΔΟΣ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ

- Για τα ΦΕΚ από 1 μέχρι 8 σελίδες 200 δρχ.
- Για τα ΦΕΚ από 8 σελίδες και πάνω η τιμή πώλησης κάθε φύλλου (8σέλιδου ή μέρους αυτού) προσαυξάνεται κατά 100 δρχ. ανά 8σέλιδο ή μέρος αυτού.
- Για τα ΦΕΚ του Τεύχους Προκηρύξεων Α.Σ.Ε.Π. ανεξαρτήτως αριθμού σελίδων δρχ. 100. (Σε περίπτωση Πανελλήνιου Διαγωνισμού η τιμή θα προσαυξάνεται κατά δρχ. 100 ανά 8σέλιδο ή μέρος αυτού).

ΕΤΗΣΙΕΣ ΣΥΝΔΡΟΜΕΣ Φ.Ε.Κ.

Τεύχος	Κ.Α.Ε. Προϋπολογισμού 2531	Κ.Α.Ε. εσόδου υπέρ ΤΑΠΕΤ 3512
Α΄ (Νόμοι, Π.Δ., Συμβάσεις κ.λπ.)	60.000 δρχ.	3.000 δρχ.
Β΄ (Υπουργικές αποφάσεις κ.λπ.)	70.000 »	3.500 »
Γ΄ (Διορισμοί, απολύσεις κ.λπ. Δημ. Υπαλλήλων)	15.000 »	750 »
Δ΄ (Απαλλοτριώσεις, πολεοδομία κ.λπ.)	70.000 »	3.500 »
Αναπτυξιακών Πράξεων (Τ.Α.Π.Σ.)	30.000 »	1.500 »
Ν.Π.Δ.Δ. (Διορισμοί κ.λπ. προσωπικού Ν.Π.Δ.Δ.)	15.000 »	750 »
Παράρτημα (Προκηρύξεις θέσεων ΔΕΠ κ.τλ.)	5.000 »	250 »
Δελτίο Βιομηχανικής Ιδιοκτησίας (Δ.Ε.Β.Ι.)	10.000 »	500 »
Ανωτάτου Ειδικού Δικαστηρίου (Α.Ε.Δ.)	3.000 »	150 »
Προκηρύξεων Α.Σ.Ε.Π.	10.000 »	500 »
Ανωνύμων Εταιρειών & Ε.Π.Ε.	300.000 »	15.000 »
Διακηρύξεων Δημοσίων Συμβάσεων (Δ.Δ.Σ.)	50.000 »	2.500 »
ΓΙΑ ΟΛΑ ΤΑ ΤΕΥΧΗ ΕΚΤΟΣ Α.Ε. & Ε.Π.Ε.	300.000 »	15.000 »

* Οι συνδρομές του εσωτερικού προπληρώνονται στα Δημόσια Ταμεία που δίνουν αποδεικτικό είσπραξης (διπλότυπο) το οποίο με τη φροντίδα του ενδιαφερομένου πρέπει να στέλνεται στην Υπηρεσία του Εθνικού Τυπογραφείου.
* Οι συνδρομές του εξωτερικού επιβαρύνονται με το διπλάσιο των ανωτέρω τιμών.
* Η πληρωμή του υπέρ ΤΑΠΕΤ ποσοστού που αντιστοιχεί σε συνδρομές, εισπράττεται από τα Δημόσια Ταμεία.
* Οι συνδρομητές του εξωτερικού μπορούν να στέλνουν το ποσό του ΤΑΠΕΤ μαζί με το ποσό της συνδρομής.
* Οι Νομαρχιακές Αυτοδιοικήσεις, οι Δήμοι, οι Κοινότητες ως και οι επιχειρήσεις αυτών πληρώνουν το μισό χρηματικό ποσό της συνδρομής και ολόκληρο το ποσό υπέρ του ΤΑΠΕΤ.
* Η συνδρομή ισχύει για ένα χρόνο, που αρχίζει την 1η Ιανουαρίου και λήγει την 31η Δεκεμβρίου του ίδιου χρόνου. Δεν εγγράφονται συνδρομητές για μικρότερο χρονικό διάστημα.
* Η εγγραφή ή ανανέωση της συνδρομής πραγματοποιείται το αργότερο μέχρι τον Μάρτιο κάθε έτους.
* Αντίγραφα διπλοτύπων, ταχυδρομικές επιταγές και χρηματικά γραμμάτια δεν γίνονται δεκτά.

Οι υπηρεσίες εξυπηρέτησης των πολιτών λειτουργούν καθημερινά από 08.00΄ έως 13.00΄

ΑΠΟ ΤΟ ΕΘΝΙΚΟ ΤΥΠΟΓΡΑΦΕΙΟ